



FIOCRUZ

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

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FRAGMENTOS
RECOMBINANTES DE CINESINA DE *Leishmania chagasi* E/OU
PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-12 E IL-2 MURINAS**

NAIARA CARVALHO TEIXEIRA

**Salvador – Brasil
2011**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

**IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FRAGMENTOS
RECOMBINANTES DE CINESINA DE *Leishmania chagasi* E/OU
PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-12 E IL-2 MURINAS**

NAIARA CARVALHO TEIXEIRA
ORIENTADOR: DR. GERALDO GILENO DE SÁ OLIVEIRA

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

Salvador – Brasil
2011

**IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FRAGMENTOS
RECOMBINANTES DE CINESINA DE *Leishmania chagasi* E/OU
PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-12 E IL-2 MURINAS**

Naiara Carvalho Teixeira

Folha de Aprovação

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow - UFBA

Dr^a Fabíola Cardillo - Pesquisadora titular - CPqGM-FIOCRUZ-BA

Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi - Pesquisadora titular- CPqGM-FIOCRUZ-BA

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira – Pesquisador titular CPqGM-FIOCRUZ-BA- Orientador

Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores:

Minha Flora, A melhor referência de Mãe;

Os 11 anjos, Meus irmãos;

Thiago, Ao incondicional amor e amizade;

Deus e o meu pai, Meus guias.

AGRADECIMENTOS

Aproveito para expressar minha eterna gratidão a todos àqueles que acreditaram em mim nesta etapa da minha vida e que me ajudaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, em especial...

Ao meu orientador Dr. Geraldo Gileno, pela influência em minha formação desde a iniciação científica. Pela confiança em meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pelo empenho na correção da dissertação.

A Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho pelas sugestões para melhorar o trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

À minha eterna amiga e co-orientadora Dr^a. Cristiane Pinheiro, pela paciência e boa vontade em atender as minhas dúvidas, pelos vários conselhos dados e principalmente por conviver com seu exemplo de profissionalismo e alegria.

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Biointervenção e aos amigos do grupo: Laiz Paixão, Diane Serra, Mayara Goes, Bianca Paiva e Tiago Landim que me acompanharam nesta jornada, colaboraram e incentivaram sempre no trabalho.

À Elivani Sacramento pelos ensinamentos, pela amizade e disponibilidade para ajudar sempre.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelos ensinamentos, ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela infra-estrutura e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

A minha família que soube entender a minha ausência, nunca criticou minhas escolhas e sempre me incentivou a buscar o melhor, utilizando os caminhos corretos.

A Thiago Bagues pelo amor, amizade, cumplicidade e pelos conselhos dados nos momentos mais difíceis.

Às grandes amizades conquistadas ao longo da vida e toda a preocupação e cuidado demonstrados.

TEIXEIRA, Naiara Carvalho. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FRAGMENTOS RECOMBINANTES DE CINESINA DE *Leishmania chagasi* E/OU PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-12 E IL-2 MURINAS. Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

Leishmaniose visceral zoonótica (LV) é uma doença que afeta homens e cães e é causada por protozoários das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*. O cão doméstico é o principal reservatório do agente causal. Uma vacina efetiva contra a LV canina poderá contribuir para o controle da infecção e/ou doença humana e canina. A resposta imune protetora contra a LV canina é do tipo celular (Th1). Em nosso laboratório, dentre um grupo de cinco antígenos recombinantes selecionados de uma biblioteca de cDNA de *L. chagasi*, usando-se uma mistura de soro de cães naturalmente infectados e que exibiam resposta imune humoral e celular específica, um fragmento da extremidade carboxila de uma cinesina com cauda de 6 histidinas (rLci2B-NH6), para permitir a purificação, foi escolhido para a avaliação do seu potencial como candidato a componente de uma vacina contra LV canina. No presente trabalho foi avaliada a imunização de camundongos BALB/c com rLci2B-NH6/saponina em associação com os plasmídeos pcDNA3.1-scmu-IL-12 e/ou pcDNA3.1-mu-IL-2. Os animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina em associação com a IL-12 e/ou IL-2 produziram anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 específicos. Esplenócitos desses animais exibiram proliferação, mas não produziram IFN- γ ou IL-5 após estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6. Esses resultados sugerem que a adição de pcDNA3.1-mu-IL-2 no protocolo de imunização não é capaz de promover uma resposta imune predominantemente Th1. Também foi avaliada a imunização de camundongos com proteína recombinante quimérica (rLci2-NT-CT-NH6) formada pelos domínios não repetitivos presentes nas extremidades amina e carboxila codificadas pelo gene da cinesina. Camundongos BALB/c imunizados com rLci2-NT-CT-NH6 ou uma proteína recombinante quimérica controle, contendo 5 domínios repetitivos presentes em rLci2B-NH6 entre os domínios não repetitivos de rLci2-NT-CT-NH6, apresentaram produção de IgG, IgG2a e IgG1. Esplenócitos desses animais exibiram proliferação, mas não produziram IFN- γ e apenas esplenócitos dos camundongos imunizados com rLci2-NT-5R-CT-NH6 sintetizaram IL-5, após estimulação *in vitro* com as respectivas proteínas. Contudo, durante a purificação de rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 ocorreu intensa proteólise que pode ter resultado na destruição de epítopos capazes de induzir resposta Th1. Previamente, em nosso laboratório, foi observada a morte de alguns camundongos injetados com 100 μ g saponina/dose, por isso, doses menores de saponina (50 ou 25 μ g) foram avaliadas como adjuvante na indução de resposta imune a rLci2B-NH6. Os resultados da mensuração dos anticorpos foram semelhantes nos três grupos. Curiosamente, somente esplenócitos do grupo injetado com 25 μ g/dose exibiram proliferação específica. O grupo injetado com 100 μ g/dose produziu IFN- γ e IL-5 e o grupo injetado com 50 μ g/dose sintetizou IFN- γ , mas não produziu IL-5, após estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6.

Palavras-chave: vacina, leishmaniose visceral e camundongos

TEIXEIRA, Naiara Carvalho. IMMUNIZATION OF MICE WITH RECOMBINANT *Leishmania chagasi* KINESIN FRAGMENTS AND/OR PLASMIDS ENCODING MURINE IL-12 AND IL-2. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis (VL) is a disease that affects humans and dogs and is caused by protozoan species *Leishmania infantum* and *Leishmania chagasi*. There is evidence to suggest that the domestic dog is the main reservoir of the causative agent. An effective vaccine against canine VL may contribute to infection control and/or human and canine disease. The protective immune response against canine VL is cellular (Th1 type). In our laboratory, among a group of five recombinant antigens selected from a cDNA library of *L. chagasi*, using a mixture of sera from naturally infected dogs that showed humoral and cellular specific responses, one fragment of the carboxyl terminus of a kinesin with a 6 His-Tag (rLci2B-NH6) was chosen to evaluate its potential as a candidate component of a vaccine against canine VL. In the present study, we evaluated the immune response of BALB/c immunized with rLci2B-NH6/saponin in combination with pcDNA3.1-scmu-IL-12 and pcDNA3.1-mu-IL-2. The animals immunized with rLci2B-NH6 associated IL-12 and/or IL-2 produced IgG, IgG2a and IgG1 reactive to rLci2B-NH6. Splenocytes of these animals exhibited proliferation but failed to produce IFN- γ and IL-5 after *in vitro* stimulation with rLci2B-NH6. These results suggest that adding IL-2 was not enough to induce a predominantly Th1 immune response. We also analyzed the immunization of mice with recombinant chimeric (rLci2-NT-CT-NH6) formed by non-repetitive domains present in the amine and carboxyl ends encoded by the gene for kinesin. BALB/c mice immunized with rLci2-NT-CT-NH6 or a control chimeric recombinant protein containing 5 repeated domains present in rLci2B-NH6 between the domains of non-repetitive rLci2-NT-CT-NH6 showed production of IgG, IgG2a and IgG1. Splenocytes of these animals exhibited proliferation, but failed to produce IFN- γ and only splenocytes from mice immunized with rLci2-NT-5R-CT-NH6 synthesized IL-5 after *in vitro* stimulation with the respective proteins. However, during the purification rLci2-NT-CT-NH6 and rLci2-NT-5R-CT-NH6 occurred intense proteolysis that may have resulted in the destruction of epitopes capable of inducing Th1. Previously, in our laboratory, it was observed the death of some mice injected with 100 μ g saponin/dose, therefore, lower doses of saponin (50 or 25 μ g) were evaluated as an adjuvant to induce an immune response to rLci2B-NH6. The results of measuring the antibodies were similar in the three groups. Interestingly, only splenocytes from the group injected with 25 μ g/dose exhibited specific proliferation. The group injected with 100 μ g/dose produced IFN- γ and IL-5 and the group injected with 50 μ g /dose synthesized IFN- γ , but did not produce IL-5 after *in vitro* stimulation with rLci2B-NH6.

Keys word: vaccine, visceral leishmaniasis, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático das moléculas utilizadas.....	27
Figura 2	Desenho esquemático das imunizações realizadas	35
Figura 3	Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>western blot</i> para imunodeteção das proteínas recombinantes.....	41
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 1% para a avaliação da integridade dos plasmídeos pcDNA3.1 vazio, pcDNA3.1-scmu-IL-12 e pcDNA3.1-mu-IL-2.....	44
Figura 5	Avaliação da produção de anticorpos de animais imunizados com rLci2B-NH6/ saponina associado a IL-12 e/ou IL-2.....	47
Figura 6	Avaliação do ensaio de linfoproliferação de animais imunizados com rLci2B-NH6/ saponina associado a IL-12 e/ou IL-2.....	51
Figura 7	Avaliação da produção de IFN- γ e IL-5 de animais imunizados com rLci2B-NH6/ saponina associado a IL-12 e/ou IL-2.....	54
Figura 8	Avaliação da produção de anticorpos de animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina, rLci2-NT-CT-NH6/ saponina ou rLci2-NT-5R-CT-NH6/ saponina.....	57
Figura 9	Avaliação do ensaio de linfoproliferação de animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina, rLci2-NT-CT-NH6/ saponina ou rLci2-NT-5R-CT-NH6/ saponina.....	60
Figura 10	Avaliação da produção de IFN- γ e IL-5 de animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina, rLci2-NT-CT-NH6/ saponina ou rLci2-NT-5R-CT-NH6/ saponina.....	63
Figura 11	Avaliação da produção de anticorpos de animais imunizados com rLci2B-NH6 associado a diferentes doses de saponina.....	66
Figura 12	Avaliação do ensaio de linfoproliferação de animais imunizados com rLci2B-NH6 associado a diferentes doses de saponina.....	69
Figura 13	Avaliação da produção de IFN- γ e IL-5 de animais imunizados com rLci2B-NH6 associado a diferentes doses de saponina.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5R	Domínios repetitivos de rLci2B
AEL	Administração por eletroporação
BCIP	fosfato de bromo cloro indolil
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CMNSP	Células mononucleares de sangue periférico
Con A	concanavalina A
cpm	Contagem de partículas betas por minuto
CT	Região carboxi-terminal
D.O.	Densidade óptica
DMSO	dimetilsufóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EL	Eletroporação
ELISA	ensaio imunoenzimático
EU	Unidades de endotoxina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
His	Histidina
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	isopropil- β -D-thiogalactosídeo
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NBT	Nitrozultetrazólio-dimetil formamida
NH6	Cauda de 6 histidinas na região NT
NK	<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
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TAE	Tris-acetato-EDTA
Th	Linfócitos T auxiliares
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL.....	16
2.2 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA <i>Leishmania donovani</i>.....	17
2.3 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	18
2.4. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS.....	19
2.5. ASPECTOS GERAIS DA INTERLEUCINA 12	19
2.6. ASPECTOS GERAIS DA INTERLEUCINA 2.....	20
2.7. SINERGISMO ENTRE IL-12 E IL-2 NA RESPOSTA IMUNE.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 ANTÍGENOS.....	24
4.1.1 Lisado de formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania chagasi</i>	24
4.1.2 Antígenos recombinantes de <i>Leishmania chagasi</i> (rLci2B, rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT).....	25
4.1.3 Purificação das proteínas rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6.....	28
4.1.4 Imunodeteção das proteínas rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6.....	30
4.1.5. Obtenção de plasmídeos: pcDNA3.1-scmu-IL-12 e pcDNA3.1-mu-IL-2.....	32

4.2 ANIMAIS.....	33
4.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	33
4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	36
4.4.1 Mensuração da concentração de anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 por ELISA.....	36
4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR.....	37
4.5.1 Ensaio de linfoproliferação.....	37
4.5.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ e IL-5) por esplenócitos através de ELISA.....	38
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS	40
5.1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6	40
5.2. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	43
5.3 RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM rLci2B-NH6/SAPONINA ASSOCIADO A PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-2 E/OU IL-12.	45
5.3.1 Avaliação da resposta imune humoral.....	45
5.3.2 Avaliação da resposta celular.....	49
5.3.2.1. Ensaio de linfoproliferação.....	49
5.3.2.2. Produção de IFN- γ e IL-5.....	53
5.4. RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT- NH6 ASSOCIADO A SAPONINA.....	55
5.4.1 Avaliação da resposta imune humoral.....	55
5.4.2 Avaliação da resposta celular.....	59
5.4.2.1. Ensaio de linfoproliferação.....	59

5.4.2.2. Produção de IFN- γ e IL-5.....	62
5.5. RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM rLci2B-NH6 ASSOCIADA A DIFERENTES DOSES DE SAPONINA	64
5.5.1 Avaliação da resposta imune humoral.....	64
5.5.2 Avaliação da resposta celular.....	68
5.5.2.1. Ensaio de linfoproliferação.....	68
5.5.2.2. Produção de IFN- γ e IL-5.....	79
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, composto por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON *et al.*, 1987). *Leishmania donovani* é a espécie causadora da doença no subcontinente indiano, em partes da Ásia e na África, enquanto que, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, espécies geneticamente indistinguíveis (MAURÍCIO *et al.*, 2000; LUKES *et al.*, 2007), causam uma zoonose que afeta, especialmente, a Bacia Mediterrânea, a região central e o sudoeste da Ásia e a América do Sul (DESJEUX, 2001). A infecção natural ocorre após a inoculação de formas promastigotas infectantes do parasito, através da picada de insetos vetores conhecidos vulgarmente como flebótomos, que pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (LAINSON *et al.*, 1977).

A LV pode apresentar-se no ser humano como uma doença grave, debilitante, potencialmente fatal caso não seja instituído o tratamento adequado. No Brasil, a leishmaniose visceral é uma zoonose causada por *L. chagasi* que afeta tanto ser humano quanto o cão doméstico, sendo este último o principal reservatório do agente causal. No passado a doença ocorria tipicamente em ambientes rurais. Atualmente, tem sido registrado um aumento no número de casos registrados em várias regiões do país, inclusive em áreas urbanas e periféricas de grandes cidades (JERONIMO *et al.*, 1994; MARZOCHI *et al.*, 1994, Ministério da Saúde, 2009).

Entre as medidas adotadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV está a identificação e eliminação de cães infectados por *Leishmania* (Ministério da Saúde, 2009). Vários autores sugerem que o índice de infecção canina nas áreas endêmicas é bastante alto, podendo atingir a cifra de 80% dos animais (BERRAHAL *et al.*, 1996, SOLANO-GALLEGO *et al.* 2001, COURTENAY O, *et al* 2002). As atividades de vigilância epidemiológica são dispendiosas e, provavelmente, necessitam ser implementadas por um longo período para que surtam efeitos.

O cão doméstico (*Canis familiaris*) parece ser o principal reservatório da *L. chagasi* em áreas urbanas e peri-urbanas (DEANE & DEANE, 1954; QUEIROZ, 2009). Uma alternativa para o controle da LV zoonótica seria o desenvolvimento de uma vacina contra LV

canina (TESH, 1995; DYE, 1996) que fosse capaz de impedir ou reduzir a transmissão da *Leishmania* do cão para o flebótomo. Para o desenvolvimento de uma vacina, como existem informações que indicam que a resposta imune protetora contra a LV canina e do tipo celular (tipo Th1), em ensaios de imunização procuram-se protocolos capazes de induzir este tipo de resposta imune. Depois disso, protocolos capazes de induzir resposta imune específica contra antígenos de *Leishmania* são avaliados quanto à capacidade de induzir proteção contra o desafio pela infecção.

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra LV em nosso laboratório, a partir de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas de *L. chagasi*, foram selecionados cinco antígenos recombinantes diferentes do parasito (rLci1, rLci2B, rLci3, rLci4 e um que foi perdido ao longo dos experimentos) naturalmente imunogênicos para o cão. Para a seleção desses antígenos foi utilizada uma mistura de soro de quatro cães naturalmente infectados (com confirmação parasitológica) e que revelavam resposta imune humoral e celular específica (TEIXEIRA *et al*, 2007). Um desses antígenos, produzido com cauda de seis histidinas na extremidade amina (NT), rLci2B-NH6, foi escolhido arbitrariamente para a avaliação do seu potencial como candidato vacinal, inicialmente, usando-se o modelo murino. Fraga (2007) avaliou a resposta imune induzida pelo antígeno recombinante rLci2B-NH6 (denominado anteriormente como Lc9). A imunização de camundongos com rLci2B-NH6 separadamente ou com alguns adjuvantes (adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio, óleo de amendoim ou plasmídeo codificando IL-12 murina na forma de proteína de fusão de cadeia única (pcDNA3.1-mu-IL-12), administrado por eletroporação (AEL), aplicadas em três doses, resultou na indução de resposta imune do tipo Th2. O único adjuvante que promoveu desvio da resposta imune específica para Th1 foi a saponina, que induziu a produção de anticorpos da subclasse de IgG2a, resposta linfoproliferativa e produção de interferon gama (IFN- γ) por esplenócitos. Contudo, os animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina também produziram anticorpos IgG1 e IL-5 por esplenócitos, sugerindo que esses camundongos desenvolveram uma resposta imune mista (Th1/Th2). Pinheiro (2007) avaliou em camundongos BALB/c a imunização com rLci2B-NH6/ saponina em combinação com diferentes doses de pcDNA3.1-scmu-IL-12 AEL (50, 10, 2 ou 0,4 μ g) na primeira dose, seguida de duas doses de rLci2B-NH6/saponina. A administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12

em qualquer das doses utilizadas não promoveu desvio adicional da resposta imune específica para o tipo Th1.

Como IL-2 apresenta sinergia com IL-12 na indução da produção de IFN- γ (KOBAYASHI *et al.*, 1989, GOLLOB, *et al* 2000) e, a combinação de IL-12 e IL-2 poderia ser mais eficiente que IL-12 separadamente na promoção de resposta imune Th1 a antígenos co-administrados, no presente trabalho, foi avaliada a imunização de camundongos BALB/c com rLci2B-NH6/saponina em combinação com pcDNA3.1-mu-IL-12 e pcDNA3.1-mu-IL-2 e a resposta imune específica observada foi Th1/Th2. A proteína rLci2B-NH6 corresponde a um fragmento de cinesina que possui ~5,5 domínios com motivos repetitivos (5R) de 39 aminoácidos (AA) seguido de um domínio não repetitivo de 76 AA. Domínios repetitivos, provavelmente, tendem a favorecer a apresentação de antígenos por linfócitos B e a indução de resposta imune humoral, do tipo Th2 (GOTO *et al*, 2006, DEY *et al.*, 2008). O produto do gene que codifica rLci2B possui um segmento não repetitivo de 701 AA na extremidade amina (NT) (BURNS, *et al.*, 2003; GERALD *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, submetido à publicação) A partir das informações acima, uma proteína recombinante não repetitiva contendo os 701 AA da região NT do gene que codifica rLci2B e o segmento CT da rLci2B (rLci2-NT-CT-NH6) foi produzida, a partir de construções plasmídeais elaboradas, bem como uma proteína controle (rLci2-NT-5R-CT-NH6), visando a imunização de animais e indução de resposta imune do tipo Th1. Além disso, como ao longo de vários experimentos de imunização em nosso laboratório foi observada a morte de alguns camundongos injetados com 100 μ g saponina/dose, às vezes prejudicando a análise estatística, no presente trabalho, doses menores de saponina (50 ou 25 μ g) foram avaliadas como adjuvante na indução de resposta imune a rLci2B-NH6.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmaniose visceral é um sério e crescente problema de saúde pública. Aproximadamente 300 milhões de pessoas moram ou viajam para regiões tropicais ou subtropicais de risco. A leishmaniose é endêmica em mais de 80 países e sua prevalência excede 12 milhões de casos no mundo. Anualmente, aproximadamente 500 mil casos de LV ocorrem no mundo, 90% dos casos ocorrem na Índia, Sudão, Nepal, Bangladesh e Brasil (DESJEUX 2001; SUNDAR, 2001).

A LV é uma enfermidade causada por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e ao gênero *Leishmania* (RIOUX *et al.*, 1990). As espécies que, mais freqüentemente, causam a doença formam o complexo *donovani*: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, (LAINSON *et al.*, 1987; MURRAY *et al.*, 2005). A *L. donovani* é a espécie causadora da doença no subcontinente indiano, em partes da Ásia e na África, enquanto que, a *L. infantum*, espécie que provavelmente é indistinguível da *L. chagasi*, causa uma zoonose que afeta, especialmente, a Bacia Mediterrânea, a região central e o sudoeste da Ásia e a América do Sul (MAURICIO *et al.*, 1999; DESJEUX, 2001).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são heteroxênicos, ou seja, durante seu ciclo de vida necessitam de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. O inseto vetor, vulgarmente conhecido como flebótomo, adquire o protozoário durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Os protozoários se transformam em promastigotas no tubo digestivo do inseto. As formas promastigotas, que exibem um flagelo se aderem às vilosidades das células que revestem o intestino do inseto, proliferam e passam por uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas, resultando nas formas promastigotas metacíclicas (infectantes) (RITTIG & BOGDAN, 2000). Quando o flebótomo realiza um novo repasto sanguíneo, pode ocorrer inoculação de promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro vertebrado, seguida de fagocitose por macrófagos e transformação em formas amastigotas. As formas amastigotas podem proliferar no interior de macrófagos, dentro de vesículas denominadas fagolisossomas, e posteriormente disseminar-se para órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como baço, fígado, medula óssea e linfonodos (MC ADAM

& SHARPE, 2005). Em seres humanos em áreas de risco, um dos métodos utilizados para o diagnóstico consiste na obtenção de material aspirado do baço ou da medula óssea. No entanto, o método é invasivo e pode associar-se a complicações, como hemorragia e morte (SUNDAR, 2007).

2.2 ASPECTOS GERAIS DA IMUNIDADE CONTRA *Leishmania*

MOSMANN & COFFMAN (1989) propuseram um modelo para explicar o desenvolvimento de respostas imune humoral ou celular, no qual essas respostas dependeriam de linfócitos do tipo Th1 ou Th2 (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Os linfócitos do tipo Th1 produzem IFN- γ , IL-2, IL-3, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral beta (TNF- β) são responsáveis pela imunidade celular, por reações inflamatórias, e auxílio de linfócitos B para a produção, predominantemente, de anticorpos da subclasse 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, reações alérgicas e estímulo de linfócitos B para a produção, predominantemente, de anticorpos da subclasse IgM, IgA e IgG1 (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Na LV humana, a resposta imune frente aos antígenos de *Leishmania* é complexa e ainda não é completamente compreendida. Alguns estudos apontam para a existência de uma correlação entre o desenvolvimento da doença (susceptibilidade) com a resposta imune Th2 através da alta produção de anticorpos, ausência de proliferação de linfócitos, ausência de produção de IFN- γ e produção de mRNA de IL-10, após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (NEOGY *et al.*, 1987; CARVALHO *et al.*, 1992; GHALIB HW *et al.* 1993). Por outro lado, existe uma correlação entre o controle da infecção em indivíduos assintomáticos (resistentes) e a resposta linfoproliferativa, alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-10, caracterizando uma resposta imune Th1 (CARVALHO *et al.*, 1992; D'OLIVEIRA JR *et al.*, 1997).

Ainda não são completamente compreendidos os fatores que predis põem o desenvolvimento da forma clínica polissintomática (linfadenopatia, lesões cutâneas, perda de peso, onicogribose, esplenomegalia) ou que promovem o controle, mesmo que temporário, da

infecção por *L. infantum* e *L. chagasi* no cão. Alguns estudos atribuem o controle da infecção no cão ao estabelecimento de uma resposta imune específica Th1, com linfoproliferação, produção de IFN- γ , IL-2 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), após a estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (PINELLI *et al.*, 1994, 1995; RHALEM *et al.*, 1999). O desenvolvimento deste tipo de resposta celular também está associado à ação de IL-12 (SALDARRIAGA *et al.*, 2006). A susceptibilidade, por outro lado, está correlacionada com ausência de resposta linfoproliferativa bem como a ausência da produção de IFN- γ , IL-2 e TNF (PINELLI *et al.*, 1994; RHALEM *et al.*, 1999)

Estudos realizados em camundongos infectados experimentalmente com *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi* indicam que esses animais, independentemente da linhagem avaliada, são capazes de controlar a infecção (KAYE, 2004). Isso parece ocorrer em decorrência da predominância de resposta imune específica do tipo Th1 nesses animais (AHMED *et al.*, 2003; KAYE, 2004).

2.3. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

As medidas para o controle da leishmaniose visceral preconizadas pelo Ministério da Saúde são: 1) diagnóstico precoce e tratamento adequado de casos da doença em humanos; 2) eliminação de cães infectados; 3) utilização de inseticida no domicílio e peri-domicílio em áreas endêmicas para combate ao inseto vetor; 4) atividades em educação em saúde (Ministério da Saúde, 2006). Tais medidas aplicadas pelo Sistema de Saúde são honerosas e trabalhosas para serem mantidas de forma sistemática e por longo prazo. Uma alternativa para o controle da leishmaniose visceral zoonótica seria a prevenção da infecção canina e/ou da transmissão do parasito do cão para o inseto vetor. Assim, a utilização de uma vacina efetiva para uso canino, culminaria, provavelmente, na redução da incidência de LV humana (DYE, 1996; MORENO & ALVAR, 2002).

Há mais de três décadas pesquisadores vêm trabalhando com o objetivo de desenvolver uma vacina contra leishmaniose visceral canina. As formulações vacinais que foram estudadas de forma mais avançada foram elaboradas com Fucose-Manose-Ligantes de

Leishmania donovani (FML/saponina, comercializada com o nome de Leishmune, BORJA-CABRERA *et al.* 2002), proteína A2/saponina (comercializada com o nome de Leish-Tec, de *Leishmania infantum*, FERNANDES *et al.*, 2008) e fatores secretados/excretados de *Leishmania infantum* (LiESAp-MDP, LEMESRE *et al.* 2007). Contudo, os resultados obtidos com essas formulações vacinais ainda não confirmados de forma independente, usando-se uma metodologia adequada, por outros grupos pesquisa. Por isso, o Ministério da Saúde ainda não recomenda o uso de Leishmune ou LeishTech para o controle da leishmaniose visceral no Brasil (Nota Técnica).

2.4. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Muitos experimentos são realizados no sentido de caracterizar a resposta imune induzida por antígenos candidatos à vacina contra LV canina, incluindo parasitas vivos ou mortos, antígenos purificados, antígenos recombinantes, bactérias vivas expressando antígenos recombinantes e plasmídeos codificando antígenos (MIRÓ *et al.*, 2008). A avaliação da resposta imune de indivíduos após a administração de antígenos produzidos por DNA plasmidial vem sendo realizada. Além disso, formulações que favoreçam a distribuição de plasmídeos, a otimização de plasmídeos (com otimização de códons (ANDRE *et al.* 1998, SCHNEIDER *et al.*, 1997), a adição de seqüência líder para promover a secreção de proteínas (YANG *et al.*, 2001) e métodos para aumentar a entrada de plasmídeo em células teciduais e, conseqüentemente, promover a expressão de proteínas recombinantes codificadas pelo plasmídeo, tem sido desenvolvida (AIHARA, 1998).

Também tem sido estudado o uso de agentes imunomoduladores (administrados na forma de plasmídeo, por exemplo, codificando citocinas) em combinação com antígenos (BOYER *et al.* 2005). Além disso, outros adjuvantes tem sido utilizados, incluindo saponina que pode contribuir para a indução de resposta imune Th1 apropriada para controle de infecções por patógenos intracelulares (SOLTYSIK *et al.* 1995).

2.5. ASPECTOS GERAIS DA INTERLEUCINA 12

A IL-12 foi descoberta pela capacidade de promover o amadurecimento de linfócitos citotóxicos ou estimular células NK (WONG *et al.* 1988; STERN *et al.* 1990; KOBAYASHI. *et*

al., 1989). Nesses estudos, a IL-12 mostrou-se capaz de promover a produção de IFN- γ por CMNSP e atividade lítica de NK.

A IL-12 é uma proteína heterodimérica composta das subunidades denominadas p40 (40 kDa) e p35 (35 kDa), ambas glicosiladas e unidas entre si por pontes dissulfídicas (STERN *et al* 1990; KOBAYASHI *et al* 1989). E a IL-12 humana foi originalmente clonada, a partir de células linfoblastóides B por dois grupos de pesquisa diferentes (GUBLER *et al.*, 1991; WOLF *et al.*, 1991).

A IL-12 é uma citocina produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, micróglia, células dendríticas e, em menor escala, por linfócitos B apresentadores de antígeno, mediante estímulos inflamatórios gerados por bactérias, parasitos intracelulares e fungos (TRINCHIERI *et al* 2003). IL-12 é capaz de contribuir para a proliferação bem como para a produção IFN- γ por células NK e células T CD4⁺ e T CD8⁺ (GATELY *et al.*, 1991). IFN- γ por sua vez promove a atividade microbicida e a expressão de MHC classe I e MHC classe II em células fagocíticas, deflagrando a resposta imune inata e regulando a diferenciação e expansão de populações de linfócitos Th1 CD4⁺ antígenos-específicos e CD8⁺ (WATFORD *et al.*, 2003).

IL-12 mostrou-se capaz de promover a regressão de tumores primários em ratos, desenvolvimento de metástases, e induzir uma resposta imune protetora antitumoral de longa duração contra neoplasias (NASTALA *et al.*, 1994). Alguns trabalhos demonstraram que IL-12 pode exercer uma toxicidade intensa após a administração de IL-12 em camundongos, primatas e no homem que, pelo menos em parte, depende da indução da produção de IFN- γ (LEONARD *et al* 1997).

Devido às suas propriedades biológicas, incluindo a capacidade de reverter resposta imune em curso, para o tipo Th1 (HSIEH *et al.*, 1993), vários pesquisadores investigam o potencial de IL-12 como imunomodulador, especialmente em enfermidades onde o estabelecimento de resposta Th2 é prejudicial ao indivíduo.

2.6. ASPECTOS GERAIS DA INTERLEUCINA 2

A IL-2 é uma glicoproteína monomérica com peso molecular de cerca de 15 kDa (TANIGUCHI *et al.*, 1983), secretada naturalmente por linfócitos ativados por estímulos

mitogênicos e antigênicos, é capaz de promover proliferação de linfócitos T (SMITH, 1980) e citotoxicidade mediada por células NK (HENNEY *et al.*, 1981). A IL-2 é secretada principalmente por linfócitos T, sendo as células Th1 as que mais produzem IL-2 após estímulo antigênico (ABBAS & LICHTMAN, 2003) Algumas APC, como linfócitos B (WALKER *et al.*, 1988). Células dendríticas também são capazes de produzir pequenas quantidades de IL-2 e assim contribuir para a ativação dos linfócitos T durante a exposição ao antígeno. (GRANUCCI *et al.*, 2001)

A IL-2 atua como um fator de expansão para populações de linfócitos T ativados e participa na determinação da magnitude e da duração da resposta imune primária e de memória. Durante o estabelecimento da resposta imune contra um determinado patógeno, a expansão seletiva de populações de linfócitos T depende da produção e secreção de IL-2 e de seu receptor de alta afinidade na superfície da célula ativada (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

A IL-2 participa da regulação da resposta imune e do controle do estabelecimento de autoimunidade. Quando ocorre persistência do estímulo antigênico, a IL-2 também contribui para a expressão de Fas-L por linfócito que, ao interagir com seu ligante (Fas), induz a morte programada de populações de linfócitos T ativados, contribuindo para a homeostase na resposta imune (VAN PARIJS & ABBAS, 1998; REFAELI *et al.*, 1998).

Quando administrada *in vivo*, a IL-2 promove proliferação, principalmente no fígado, baço, rins, linfonodos e cérebro, de uma população de células com características de linfócitos citotóxicos (ORTALDO *et al.*, 2005). Além disso, logo após a administração de IL-2, observa-se aumento transitório da concentração sérica de IFN- γ secretado por células NK (ORTALDO *et al.*, 2005).

Em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania donovani*, o tratamento com IL-2 promove a formação de granulomas bem desenvolvidos, capazes de isolar o parasito, com expressão de IFN- γ no tecido hepático (MURRAY *et al.*, 1993).

2.7. SINERGISMO DA IL-12 E IL-2 NA RESPOSTA IMUNE

IL-2 e IL-12, separadamente, são capazes de induzir a produção de IFN- γ por células NK. Além disso, IL-12 e IL-2 usadas em combinação exercem atividade sinérgica na indução

da produção de IFN- γ por células NK (TRINCHIERI *et al.*, 1984 KOBAYASHI *et al.*, 1989, CHAN *et al.*, 1991). Além de favorecer a produção de IFN- γ , as duas citocinas usadas em combinação aumentam a atividade lítica de células NK. Doses sub-ótimas de IL-12 (2 U/mL) combinadas com IL-2 (60 U/mL) são capazes de induzir aumento de atividade lítica de células NK correspondente ao dobro da atividade promovida por cada uma dessas citocinas usadas separadamente. O aumento da citotoxicidade relaciona-se à maior expressão de granzimas e perforinas (BLAKER-HOHE *et al.*, 1995).

O sinergismo dessas citocinas pode ser explorado no uso de doses de IL-12 e IL-2 que, separadamente, sejam sub-ótimas, mas que em combinação conduza a efeitos terapêuticos ou imunomodulatórios, diminuindo o risco de efeitos tóxicos promovidos por maiores doses de cada uma quando utilizadas isoladamente (KAUFMAN *et al.*, 2002). Resultados de produção de IFN- γ , bem como nas células T pré ativadas, células NK expostas a células T helper 1 (Th1) como interleucinas-2 (IL-2), IL-12, ou IL-18 resultam na expressão de IFN- γ . (BIRON *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

3.1. GERAL

Determinar as condições para indução de resposta imune do tipo Th1 contra antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a produção de anticorpos, proliferação celular e produção de citocinas em camundongos BALB/c imunizados com:

- rLci2B-NH6/saponina associado a plasmídeos codificando IL-12 e/ou IL-2;
- Antígenos recombinantes com codóns otimizados: rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6
- rLci2B-NH6 associado a diferentes doses de saponina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.1.1 LISADO DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *Leishmania chagasi*.

Tecido macerado de um fragmento de baço de hamster infectado com *Leishmania chagasi* da cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2, cepa inicialmente obtida de paciente com leishmaniose visceral do município de Jequié-Bahia (BALEEIRO *et al.*, 2006), foi cultivado em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) pH 7,2 suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL Life Technologies, EUA) inativado (meio Schneider suplementado) a 24 °C por 4 dias. As formas promastigotas resultantes foram submetidas a seis passagens em meio Schneider suplementado para eliminação de debris de tecido esplênico. Para a obtenção das formas amastigotas axênicas, formas promastigotas em uma concentração de 5×10^6 parasitos/mL, foram cultivadas a 24°C, por 3-5 dias, até o início da fase estacionária e posteriormente foram transferidas para estufa a 37°C. Após 13 dias de cultivo, formas amastigotas axênicas (TEIXEIRA *et al.*, 2007) foram lavadas 3 vezes em salina (Glicolabor, São Paulo, Brasil), centrifugando-se a 2.500 x g, por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, os parasitos em suspensão foram submetidos a lise por 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 4°C. O lisado foi dividido em duas partes. Uma parte para ser usada sem modificação adicional (denominada lisado total) e a outra parte para ser usado somente o sobrenadante obtido após centrifugação a 2.500 x g, por 5 minutos a 4°C (denominado fração solúvel). Várias alíquotas de lisado total ou da fração solúvel foram congeladas a -20°C até o momento do uso. Uma alíquota do lisado total e outra da fração solúvel foram utilizadas para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry modificado. A modificação realizada consistiu na solubilização de cada amostra de 100µL de mistura de proteínas com 100µL hidróxido de sódio a 2N e aquecimento a 100°C, por 10 minutos, antes da realização do ensaio (WATERBORG, 2002). Para a esterilização do material, as alíquotas do lisado de *Leishmania chagasi* foram submetidas à luz ultravioleta por 30 minutos sob gelo em uma capela de fluxo laminar antes de serem utilizados nos ensaios de linfoproliferação e indução da produção de citocinas.

4.1.2 ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi* (rLci2B, rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT)

A seleção do antígeno rLci2B (anteriormente denominado rLc9) já foi descrita previamente em trabalhos realizados em nosso laboratório (PINHEIRO, 2007). Resumidamente, quatro antígenos recombinantes de *L. chagasi* foram selecionados a partir de uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 (BALEEIRO *et al.*, 2006) confeccionada em fago lambda, usando-se uma mistura de soros de quatro cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, com infecção confirmada parasitologicamente, que apresentavam resposta imune humoral e celular específica (TEIXEIRA *et al.*, 2007 e OLIVEIRA *et al.*, 2011, submetido à publicação). Após a excisão dos clones de fagos selecionados para a obtenção de plasmídeo *pBK-CMV* contendo cDNA *L. chagasi*, os quatro antígenos foram caracterizados pelo seqüenciamento parcial das extremidades 5' e 3' ou seqüência completa de DNA dos insertos. As seqüências foram comparadas com a utilização dos bancos de dados GeneDb do Instituto Sanger (www.genedb.org), Reino Unido, e GenBank do Instituto Nacional para Informação Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov), Estados Unidos da América. Um dos antígenos, denominado rLci2B, foi escolhido arbitrariamente para a realização de estudos visando o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral. O antígeno rLci2B possui ~5,5 domínios com motivos repetitivos na extremidade amina (NT) seguidos de um segmento não repetitivo que corresponde a extremidade carboxila terminal (CT) do produto do gene *LinJ14_V3.1180* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A seqüência deduzida de aminoácidos da extremidade amina da proteína codificada pelo gene de *L. chagasi* ou a seqüência completa do gene homólogo de *L. donovani* já haviam sido relatadas anteriormente (BURNS *et al.*, 1993; GERALD *et al.*, 2007). O inserto *Lci2B* foi subclonado em plasmídeo *pRSET* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), gerando a construção *pRSETB-Lci2B*, capaz de promover super-expressão do polipeptídeo recombinante rLci2B-NH6 que possui cauda de histidina na extremidade amina (Figura 1) na linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen).

Os domínios com motivos repetitivos (39AA) devem promover a resposta imune humoral, visando favorecer a indução de uma resposta imune do tipo Th1. Assim, uma nova

construção (*Lci2-NT-CT*) foi concebida de modo a produzir o polipeptídio rLci2-NT-CT-NH₆ (Figura 1B) em pRSET introduzido em *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). Esse polipeptídio é composto por uma cauda de histidina na região N-Ter, pelo segmento de 701 AA não repetitivo da N-Ter e o segmento de 76 AA não repetitivo da C-Term (Figura 1), correspondentes a uma seqüência de aminoácidos descrita previamente (BURNS *et al.*, 1993) e a C-Ter do produto do gene *LinJ14_V3.1180*. Como controle, foi concebida uma construção (*Lci2-NT-5R-CT*) para produzir o polipeptídio rLci2-NT-5R-CT-NH₆. Esse polipeptídio possui a mesma seqüência de aminoácidos do rLci2-NT-CT-NH₆ além da inserção de 5 domínios com motivos repetitivos de 39AA entre os domínios não repetitivos de 701AA e 76AA (Figura 1C), descritos anteriormente. A construção *Lci2-NT-5R-CT* foi elaborada através da colaboração com o Dr. Rafael Dhalia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, otimizada para a expressão em camundongos e cães, e o DNA correspondente foi sintetizado pela Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha) e inserido em um plasmídeo de clonagem (pMK). As subclonagens foram realizadas usando-se reação em cadeia da polimerase (PCR) e, depois disso, seqüenciamento dos insertos para confirmar a presença das seqüências concebidas previamente, em colaboração com Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Dessa maneira, foram geradas as construções *pRSET-Lci2-NT-CT* e *pRSET-Lci2-NT-5R-CT*.

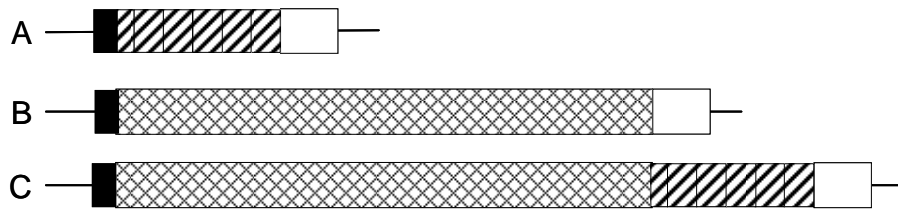


Figura 1. Desenho esquemático dos fragmentos recombinantes de cinesina de *L. chagasi* utilizados em imunização e avaliação da resposta imune. Fragmentos da cinesina: A) rLci2B-NH6, B) rLci2-NT-CT-NH6 e C) rLci2-NT-5R-CT-NH6. Os diversos domínios são mostrados: segmento de ~31 aminoácidos (AA) contendo uma cauda de 6 histidinas (NH6 = ■), segmento não repetitivo amino-terminal de 701 AA (NT=▣), segmentos de domínio com motivo repetitivo de 39 AA (5R=▤) e segmento não repetitivo carboxila-terminal de 76 AA (CT= □).

Para a produção dos antígenos rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6, *E. coli* da cepa BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) transformadas com as construções plasmídeais pRSET-Lci2B, pRSET-Lci2-NT-CT ou pRSET-Lci2-NT-5R-CT, respectivamente, foram utilizadas, seguindo-se recomendações do fabricante. Resumidamente, bactérias de colônias isoladas de BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lci2B, BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lci2-NT-CT ou BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lci2-NT-5R-CT foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo de cultura Luria-Bertani [LB: tripton a 1 % (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5 % (m/v, BD Pharmingen, San Jose, San Diego ou New Jersey, EUA) e cloreto de sódio a 1 % (m/v, Isofar, Duque de Caxias, Brasil), pH 7.0) com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich)], a 37°C, sob agitação orbital de 250 rpm, por cerca de 16 h, para a preparação de pré-inóculo. Em seguida, cada pré-inóculo foi diluído em 1L de meio LB, de modo a exibir densidade óptica de 0,1 a 600 nm, e cultivado a 37°C, a 250 rpm, até que em leitura a DO de 600nm atingisse 0,4 a 0,6 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A partir daí, para a indução da produção das proteínas recombinantes, isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Invitrogen) foi adicionado à suspensão bacteriana para alcançar uma concentração final de 0,1 mM para rLci2B-NH6 ou 0,2 mM para rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6. Alíquotas de 1 mL de cada cultura bacteriana foram coletadas antes e três horas após a indução com IPTG. Depois de 3h de incubação, cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 xg, a 4°C, por 15 minutos. Os sedimentos resultantes foram pesados e armazenados a -20°C, até o momento do uso. As alíquotas coletadas foram submetidas à centrifugação a temperatura ambiente por 5 minutos a 12.000 xg. Cada sedimento foi solubilizado em tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, SDS a 2% (mv), glicerol a 10% (v/v), ditioneitol (DTT) a 100 mM, 2-mercaptoetanol 5% (v/v), tris-hidroximetilaminometano (Tris) a 62,5 mM (pH 6,8) e azul de bromofenol a 0,01% (m/v)), fervido por 10 minutos e, depois, avaliados por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), usando sistema descontínuo com gel de separação de 12% para rLci2B-NH6 ou 10% para rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6. Após a corrida, os géis foram corados por azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) e descorados com uma solução contendo metanol 30% e ácido acético glacial 7% (SAMBROOK *et al.*, 2001).

4.1.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se coluna His Trap HP (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, cada sedimento bacteriano foi ressuspenso na razão de 3 mL de tampão de ligação (Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 20 mM, pH 7,4) para cada 1 g de sedimento com auxílio de um agitador vórtex (Labnet, Woodbridge, Nova Jersey, EUA). Em seguida, para digerir a parede bacteriana, foi adicionada lisozima (Sigma-Aldrich) em concentração final de 1 mg/mL. Cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos sob agitação constante. Depois disso, visando a solubilização das membranas lipídicas, para cada 1 g de sedimento, foram acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich) e cada suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Com o objetivo de fragmentar o DNA genômico bacteriano, cada suspensão foi submetida à sonicação sob o gelo. A sonicação foi realizada pela aplicação de seis pulsos, com potência de 200 Watts, cada um com duração de 20 segundos e intervalo de 60 segundos entre cada dois pulsos consecutivos (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA). Cada lisado bacteriano foi centrifugado a 17.000 x g, a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante contendo rLci2B-NH6 ou os sedimentos contendo rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 depois de solubilizados em tampão 20mM Na_2HPO_4 , 500mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7,4 (Sigma-Aldrich) ou com 8 M de uréia (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) (tampão de ligação com uréia) foram passados por filtros de 0,22 μm e aplicados em colunas cromatográficas de níquel-sepharose de 1 mL (HisTrap HP, GE Healthcare Bio-Sciences, EUA). As colunas haviam sido previamente equilibradas com tampão de ligação sem ou com uréia para a purificação de rLci2B-NH6 e rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente. Visando a eliminação da maior parte dos lipopolissacarídeos (LPS) contaminantes, após a aplicação de solução de proteínas, cada coluna foi lavada com 50 mL de tampão contendo NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 31,25 mM, Triton X-114 a 0,1% (Fluka, Biochemika, France) pH 7,4; a 4°C (REICHEL, 2006) sem ou com uréia a 8 M, conforme apropriado. As colunas foram eluídas com tampão contendo Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM e imidazol a 500 mM, pH 7,4;

sem ou com uréia a 8 M. Durante o processo de eluição, frações de 1 mL foram obtidas e armazenadas a 4°C e alíquotas dessas frações foram analisadas por SDS-PAGE. As frações que continham cada proteína alvo com um bom grau de pureza foram, separadamente, misturadas e submetidas à diálise contra tampão fosfato tamponado com salina (PBS, NaCl a 137 mM, KCl a 2,68mM, Na₂HPO₄ a 9,58 mM e NaK₂PO₄ a 1,47 mM), a 4°C. Para isso, foram realizados seis banhos (com 1L de tampão/banho) de 12 horas cada. Após a diálise, para a esterilização, alíquotas das proteínas purificadas foram transferidas para tubos Eppendorf e submetidas à luz ultravioleta por 30 minutos sob o gelo, conforme descrição prévia. A concentração protéica de cada proteína recombinante foi determinada pelo método de Lowry modificado (conforme descrito previamente) e a concentração de LPS foi avaliada usando-se reagentes do conjunto QLC-1000 (Lonza, Walkersville, EUA), seguindo-se recomendações do fabricante.

4.1.4 IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6

O grau de pureza e degradação das proteínas recombinantes purificadas foram avaliados conforme métodos previamente descritos: SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e *Western blot* (TOWBIN *et al.* 1979) modificado. Para o *Western blot*, usou-se o método de transferência semi-seco em aparelho de transferência eletroforética (“trans-blot”, Bio-rad, Califórnia, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, um sistema de gel de poliacrilamida com gradiente descontínuo foi utilizado, onde dois géis foram elaborados. Cada gel contém o gel para empilhamento elaborado com 5% e abaixo o gel para separação com 12% ou 10% de bisacrilamida/acrilamida, respectivamente, em tampão Tris. Amostras de marcadores de peso molecular, de lisado de *E. coli* sem inserto, codificando as proteínas recombinantes 3h após a indução com IPTG ou uma amostra de cada proteína recombinante purificada foram colocadas em poços dos géis, conforme descrição na Figura 3. A corrida foi realizada usando-se um aparelho Hoefer SE600 (Hoefer Inc., Holliston, EUA). Um dos géis foi corado com azul de Coomassie, conforme descrito acima. O outro gel foi usado para a transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose de 45 µm (Bio-

Rad), utilizando-se o tampão Tris a 24 mM, glicina a 192 mM e metanol a 20 %, p.H 8,3 e um aparelho de transferência eletroforética (Bio-Rad). A transferência foi realizada por 1 h, usando-se 0,8 mAmp de corrente elétrica por cada cm^2 da membrana de nitrocelulose. Ao término, para a avaliação da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com o corante vermelho Ponceau (vermelho Ponceau S a 0,1% (m/v) em ácido acético glacial a 5% (v/v)), por 5 minutos sob agitação constante. Depois disso, a membrana foi lavada com H_2O destilada e pontos geográficos, como por exemplo, a linha de frente da corrida e as bandas correspondentes as moléculas indicadoras de peso molecular foram marcadas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio [Tris 24,8 mM, NaCl 137 mM (TBS), leite desnatado 5 % (m/v) e Tween 20 0,05 % (v/v), pH 8,0 (TBS-TL)], durante a noite, a 4°C. Depois de lavar 3 vezes com TBS, 5 minutos cada vez, sob agitação constante, a membrana foi montada em um aparelho “Blotter” (Immunetics, modelo MN25, Boston, EUA). Esse aparelho divide a membrana de nitrocelulose em raias individuais com canaletas correspondentes, permitindo a revelação de proteínas em cada raia separadamente. Em cada canaleta foram colocados 350 μL de anticorpo monoclonal anti-histidina N-ter (Invitrogen R-940) diluído a 1:1000 em TBS-TL. O “blotter” contendo a membrana foi incubado por 1h a temperatura ambiente, sob agitação suave. As canaletas foram lavadas 3 vezes com TBS com Tween a 0,05 % (v/v, TBS-T). Depois disso, em cada canaleta foram colocados 350 μL de anticorpos anti-imunoglobulinas camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluídos a 1:500 em TBS-TL. O “blotter” contendo a membrana foi incubado novamente por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação suave. As canaletas foram lavadas novamente 3 vezes com TBS-T. Em seguida, as canaletas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, a membrana foi transferida para um recipiente de plástico e lavada 2 vezes com TBS. Cada lavagem foi realizada em 5 minutos. Um volume de 15 mL de substrato de fosfatase alcalina foi colocado sobre a membrana, usando-se nitrozultetrazólio (NBT, Sigma-Aldrich) a 0,033 % (m/v) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma-Aldrich) a 0,0165 % (m/v) em tampão Tris a 0,1 M, NaCl a 100 mM e MgCl_2 a 5 mM, pH 9,5; seguindo-se as recomendações do fabricante. A membrana foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação suave. Depois disso, a reação enzimática foi interrompida pela adição de H_2O destilada.

4.1.5 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEO: pcDNA3.1-scmu-IL-12 e pcDNA3.1-mu-IL-2

O plasmídeo capaz de expressar IL-12 murina, como uma molécula de fusão de cadeia única (pcDNA3.1-scmu-IL-12), ou IL-2 murina (pcDNA3.1-mu-IL-2) em células de mamífero foi obtido conforme descrição prévia (SANTOS, 2007) ou gentilmente cedido pelo Dr. Hildegund C. J. Ertl, Instituto Wistar e Universidade da Pensilvânia, EUA, respectivamente. O plasmídeo pcDNA3.1 sem inserto (ou vazio) foi obtido da Invitrogen. Para a produção e purificação de plasmídeo, *E. coli* da linhagem TOP10 (Invitrogen) foi transformada por pcDNA3.1-scmu-IL-12, pcDNA3.1-muIL-2 ou pcDNA3.1 sem inserto. Para isso a bactéria quimicamente competente, após incubação com plasmídeo e choque térmico, foi cultivada por 16 horas em meio de cultura LB com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). O isolamento de plasmídeo e o processo de produção feito anteriormente foram realizados seguindo-se recomendações da Qiagen Inc., Valencia, EUA, fabricante do conjunto usado na purificação (“Endofree Plasmid Mega kit”). Resumidamente, bactérias provenientes de colônia isolada foram usadas para inocular 5 mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. Cada suspensão bacteriana foi cultivada a 37 °C, a 300 rpm, por 8 h, para gerar os pré-inóculos. Um volume de 5 mL de cada pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. Os frascos foram incubados a 37°C, a 300 rpm, por 12 a 16 h. Sedimentos bacterianos foram obtidos por centrifugação por 15 minutos a 6.000 xg, por 15 minutos, a 4°C. Depois foi utilizado o método da lise alcalina da bactéria e neutralização do pH com acetato de potássio (CH₃COOK), o sobrenadante de cada lisado foi aplicado em colunas cromatográficas de troca iônica previamente equilibradas 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). O DNA plasmideal foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol. Tubos contendo DNA plasmideal foram deixados abertos para a evaporação de vestígios de etanol. Depois disso, DNA plasmideal foi ressuspenso em solução salina (NaCl a 0,9 %, m/v) estéril, livre de endotoxinas, e armazenados a -20°C, até o momento do uso. Antes do armazenamento, alíquotas de cada preparação plasmideal foram

usadas para determinação da concentração de DNA e o grau de pureza, pela leitura da densidade óptica a 260 e 280 nm (Nanodrop, ND-1000, Thermo Scientific, EUA) e pelo fracionamento em gel de agarose a 1% com brometo de etídio (SAMBROOK *et al.*, 2001) e concentração de endotoxinas, conforme método descrito anteriormente.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 70 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre 5 e 6 semanas. Destes animais, 48 foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP/Campinas-SP) e 22 do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM). Os animais obtidos do CEMIB/UNICAMP/Campinas-SP foram usados após um período de 15 dias de adaptação ao Biotério do CPqGM. Os animais foram alojados em caixas microisoladoras sob condições adequadas de temperatura (21 ± 1 °C), umidade (50 – 60 %) e com fornecimento de ração (BioBase Base Química Prod. Quím. Ltda., Brasil) e água *ad libitum*.

Os camundongos foram utilizados seguindo-se as recomendações para experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animal do CPqGM (protocolo: CEUA-008/2009).

4.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a imunização de camundongos com rLci2B-NH6 em combinação com IL-12 e/ou IL-2, grupos de 6 animais foram injetados uma vez (primeira dose) com: salina (grupo 1: G1) ou com 100 µg de rLciB-NH6 e 100 µg de saponina (Sigma-Aldrich) (G2, G3, G4, G5 e G6), administrados em um volume de 200 µL, por via subcutânea na região dorsal. Os camundongos dos grupos G3, G4, G5 e G6 foram injetados 100 µg de pcDNA3.1 vazio, 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio, 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-2 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio e 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1-mu-IL-2, respectivamente, administrados em um volume total de 50 µL, por via muscular na região do

quadríceps. Em seguida foi realizada eletroporação (cinco pulsos elétricos de 100 V/cm com duração de 20 milissegundos por pulso e intervalo de um segundo entre cada dois pulsos consecutivos) na região do quadríceps na qual foi realizada a injeção, conforme método descrito previamente (PINHEIRO, 2007) Antes da eletroporação cada camundongo foi anestesiado pela administração de xilazina (Bayer, São Paulo, Brasil, 100 mg/kg) e quetamina (Rhobifarma, Hortolândia, Brasil, 15 mg/kg) por via peritoneal. Posteriormente, os animais foram injetados, 21 e 42 dias após a primeira dose, com salina (G1) ou 100 µg de rLciB-NH6 e 100 µg de saponina (G2, G3, G4, G5 e G6), administrados em um volume de 200 µL, por via subcutânea na região dorsal.

Para imunização de camundongos com rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6, grupos de 6 animais foram injetados 3 vezes, com intervalo de 21 dias entre cada duas injeções consecutivas, com 100 µg de rLci2-NT-CT-NH6 e 100 µg de saponina ou 100 µg de rLci2-NT-5R-CT-NH6 e 100 µg de saponina, administrados em um volume de 200 µL, na região dorsal. Os grupos de camundongos G1 e G2 descritos acima foram usados como controles, uma vez que esses dois experimentos foram realizados simultaneamente.

Para imunização de camundongos com rLci2B-NH6 e doses diferentes de saponina, grupos de 5 animais (ou 7 animais para o G2) foram injetados 3 vezes, com intervalo de 21 dias entre cada duas injeções consecutivas, com PBS ou 100 µg de rLci2-NH6 e 100 µg (G2), 50 µg (G3) ou 25 µg (G4) de saponina diluída em PBS, administrados em um volume de 200 µL, por via subcutânea na região dorsal.

Dose Grupo	1ª dose	2ª e 3ª doses
G1	Salina	Salina
G2	rLci2B-NH6 / saponina 100µg	rLci2B-NH6 / sap.
G3	pcDNA 3.1 A Ø + rLci2B-NH6 / sap.	rLci2B-NH6 / sap.
G4	pcDNA 3.1 A Ø + pC DNA 3.1 A IL-12+ rLci2B-NH6 / sap.	rLci2B-NH6 / sap
G5	pcDNA 3.1 A Ø + pC DNA 3.1 A IL-2+ rLci2B-NH6 / sap.	rLci2B-NH6 / sap.
G6	pcDNA 3.1 A IL-12 + pC DNA 3.1 A IL-2+ rLci2B-NH6 / sap.	rLci2B-NH6 / sap

Dose Grupo	1ª, 2ª e 3ª dose
G1	Salina
G2	rLci2B-NH6 / saponina 100µg.
G3	rLci2-NT-5R-CT-NH6 / saponina 100µg.
G4	rLci2 -NT-CT-NH6 / saponina 100µg.

Dose Grupo	1ª, 2ª e 3ª dose
G1	PBS
G2	rLci2B-NH6 / saponina 100µg
G3	rLci2B-NH6 / saponina 50µg
G4	rLci2B-NH6 / saponina 25µg

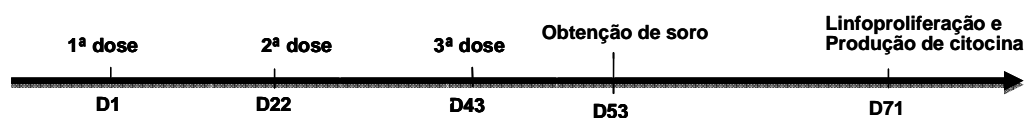


Figura 2. Desenho esquemático das imunizações realizadas nos experimentos. As imunizações de camundongos com os fragmentos de cinesina de *Leishmania chagasi* foram realizadas em três diferentes experimentos. Para a imunização de camundongos foram realizadas três doses, com intervalo de 21 dias entre cada duas injeções consecutivas com diferentes combinações. Dez dias após a terceira dose foi realizado coleta de sangue para posterior avaliação da resposta imune humoral. Quatro semanas após a terceira dose os animais foram sacrificados para remoção do baço e posterior obtenção dos esplenócitos utilizados para a avaliação da resposta imune celular.

4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para a avaliação da produção de anticorpos específicos por ELISA, foi realizada a coleta de uma amostra de sangue de cada animal, de cerca de 100 μ L, 10 dias após a terceira dose de imunização. Cada coleta de sangue foi realizada através do plexo orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur, após anestesia local pela aplicação de uma gota de cloridrato de proximetacaína a 0,5 % (Anestalcon, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Após a coagulação das amostras de sangue em tubos Eppendorf, os tubos foram centrifugados a 300 x g, por 10 minutos, a temperatura ambiente e, depois disso, alíquotas de soro foram armazenadas a -20 °C, até o momento do uso.

4.4.1 MENSURAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DA CLASSE IgG E DAS SUBCLASSES IgG2a E IgG1 POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Para a determinação da concentração de anticorpos específicos da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1, ELISAs foram realizados, essencialmente, conforme métodos descritos previamente (FRAGA, 2007). Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de rLci2B-HN6, rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 na concentração de 1 μ g/mL. Antes da sensibilização, as proteínas foram solubilizadas com SDS a 2 % (SANTOS, 2007). Para a mensuração de IgG anti-rLci2B-NH6, anti-rLci2-NT-CT-NH6 e anti-rLci2-NT-5T-CT-NH6 amostras de soro foram testadas na diluição de 1:50.000, 1:30.000 e 1:30.000 em 100 μ L/poço, respectivamente. Para a mensuração de IgG2a ou IgG1 anti-Lci2B-NH6, anti-Lci2-NT-CT-NH6 e anti-Lci2-NT-5T-CT-NH6 as amostras de soro foram testadas na diluição de 1:150.000, 1:32.000, 1:32.000 em 100 μ L/poço, respectivamente. Para a escolha das diluições apropriadas para avaliação, amostras de soro de cada animal (para IgG) ou misturas com quantidades iguais de soros de cada grupo de animais (para IgG2a e IgG1) foram submetidas, previamente, à titulação. Depois disso, anticorpos de cabra conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich) específicos para IgG de camundongos (na diluição de 1:2.000) ou anticorpos específicos para anti-IgG2a ou

anti-IgG1 de camundongos conjugados à biotina (na diluição de 1:500, Sigma-Aldrich) seguidos de conjugado avidina-peroxidase (na diluição de 1:400) foram utilizados em 100 μ L/poço. Em seguida, 100 μ L/poço de substrato para peroxidase. O substrato para a mensuração de IgG foi preparado em tampão acetato/citrato (10 mg/mL de tetrametilbenzidina-TMB; Sigma-Aldrich, em acetato de sódio (CH_3COONa) a 0,024 M, ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) a 0,00075 mM e 25 μ L de H_2O_2 a 30 %, v/v (Proquímios, Rio de Janeiro) e para a mensuração das subclasses de IgG foi preparado em tampão fosfato/citrato (1 mg/mL de TMB em fosfato a 0,046 M, citrato a 0,022 M, pH 5,0 com 2 μ L de H_2O_2 a 30 %, v/v). Finalmente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico 4M para mensuração de IgG (Quimex, São Paulo, Brasil) ou ácido fosfórico (Quimex) a 1:20 para as subclasses de IgG e as placas foram submetidas à leitura da densidade óptica a 450 nm em um espectrofotômetro (Emax Precison Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, EUA). EMax exibe linearidade de leitura entre 0,001 a 3 unidades de densidade óptica.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

Para avaliação da resposta imune celular, ensaios de proliferação ou cultivos de esplenócitos, seguidos mensuração de interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) e interleucina-5 (IL-5) nos sobrenadantes, foram realizados, conforme métodos descritos previamente (SANTOS, 2007), 4 semanas após a última dose de imunização. Resumidamente, após o sacrifício de cada camundongo, o baço foi removido assepticamente e usado para elaboração de suspensão de células nos ensaios isoladas.

4.5.1 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Para a realização dos ensaios de linfoproliferação, alíquotas de 100 μ L contendo 3×10^5 esplenócitos de cada camundongo, ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado (RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino, Gibco BRL Life Technologies, EUA, L-glutamina a 2 mM, Sigma-Aldrich, e 2-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, a 0,01 mM) foram

colocadas em poços de placas de microtitulação de 96 poços (High Binding; Corning Incorporated Life Sciences, New York, EUA). Às triplicatas de poços com esplenócitos de cada animal, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 suplementado ou 100 µL de RPMI 1640 suplementado com concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich) a 5 µg/mL; lisado de *L. chagasi* a 20 µg/mL ou rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2NT-5R-CT-NH6 a 20 µg/mL. As placas de microtitulação foram incubadas em estufa a 37 °C, úmida e com 5% de CO₂. Placas com poços contendo meio de cultura suplementado ou meio de cultura suplementado com Con A foram congeladas a -20°C após 3 dias do início da cultura. Placas com poços contendo meio de cultura suplementado ou meio de cultura suplementado contendo lisado de *L. chagasi* ou antígenos recombinantes foram congeladas a -20°C após 5 dias do início da cultura. A cada poço, foram adicionados 30 µL de meio de cultura suplementado contendo 1 µCi de timidina [H]³⁺ (Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia) 18 horas antes do congelamento. As placas foram descongeladas, as células foram coletadas em membrana de fibra de vidro e foram realizadas contagens de partículas betas por minuto (cpm), correspondentes a cada poço, em um aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard, Houston, Texas, EUA). Os resultados foram apresentados como índice de proliferação (média aritmética dos valores de cpm de células estimuladas/média aritmética dos valores de cpm de células cultivadas apenas com meio de cultura suplementado).

4.5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IFN- γ e IL-5) POR ESPLENÓCITOS ATRAVÉS DE ELISA

Para a mensuração da concentração das citocinas (IFN- γ e IL-5), esplenócitos ($9 \times 10^5/300 \mu\text{L}/\text{poço}$) foram colocados em placas de 24 poços (Costar Corning Inc.) usando-se RPMI suplementado. A cada duplicata de poços foram adicionados 300 µL de meio de cultura suplementado ou 300 µL de meio de cultura suplementado contendo Con A a 5 µg/mL, lisado de *L. chagasi* a 20 µg/mL ou rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2 NT-5R-CT a 20 µg/mL. Após 48 horas de cultura a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂, os sobrenadantes de cada duplicata foram coletados, misturados e submetidos à centrifugação por 5 minutos, a

2.000 xg, a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram congelados a -20°C, até o momento do uso.

Os ensaios para a mensuração de IFN- γ e IL-5 foram realizados usando-se reagentes da BD Pharmigen e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços (High Binding, Corning Incorporated Life Sciences) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de rato anti-IFN- γ ou anti-IL-5 murinos a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, durante 16 h, em câmara úmida, a 4°C. As amostras de sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou Con A (sobrenadantes estimulados com Con A foram diluídos de 1:5 para mensuração de IFN- γ) de cada camundongo foram avaliadas em duplicatas com 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$. Misturas com partes iguais de sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais de cada grupo, cultivados somente com RPMI 1640 suplementado ou estimulados com lisado de *L. chagasi*, foram avaliadas em duplicatas. A cada poço foram acrescentados 100 μL de anticorpo de rato anti-IFN- γ ou anti-IL-5 de camundongo conjugado com biotina (na diluição de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguidos de 100 μL de conjugado avidina-peroxidase (na diluição de 1:400, Sigma-Aldrich). A reação enzimática foi revelada, interrompida, e a leitura dos poços foi realizada como descrito acima para mensuração das subclasses de imunoglobulina.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da resposta imune humoral e celular entre vários grupos foram avaliados através do Teste Paramétrico de Análise de Variância (One-way ANOVA), seguido da comparação adicional entre os grupos pelo pós-teste de Tukey. Entre dois grupos, foi realizado o teste T de Student não pareado. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT

As proteínas rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 produzidas em *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com as construções plasmídeais pRSET-Lci2B, pRSET-Lci2-NT-CT e pRSET-Lci2-NT-5R-CT, respectivamente, foram purificadas por cromatografia de afinidade usando-se colunas de sepharose quelada com níquel. A proteína rLci2B-NH6 foi purificada em uma coluna pré-montada (coluna HisTrap HP, GE Healthcare) e as proteínas rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 foram purificadas em colunas montadas em nosso laboratório. rLci2B-NH6 foi purificada da fração solúvel e rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 foram purificadas depois da solubilização de corpúsculos de inclusão pelo uso de uréia a 8 M. Durante o processo de purificação, após a ligação das proteínas recombinantes, as resinas das colunas foram lavadas com um tampão mantido a 4 °C, contendo o detergente Triton X-114 para remoção de LPS. Depois da eluição das colunas por imidazol e diálise da mistura de frações enriquecidas em cada proteína recombinante, as concentrações de proteína e LPS observadas foram 1,2 mg/mL, 8,2 EU/mL (~14,76 ng/mL); 2 mg/mL, 7,0 EU/mL (~12,60 ng/mL) e 1 mg/mL, 6,7 EU/mL (~12,06 ng/mL), sendo o rendimento 3 mg, 2,5 mg e 1,06 mg por litro de cultura de *E. coli*, para rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente. Quando amostras de rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 purificadas foram analisadas por SDS-PAGE observaram-se uma banda intensa de 39 kDa, uma banda de fraca intensidade de 97 kDa e uma banda de fraca intensidade de 116 kDa, respectivamente, que parecem corresponder à moléculas intactas (Figura 3A e B). Além disso, foram observadas algumas bandas (nas amostras de rLci2B-NH6) ou várias bandas (nas amostras de rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6) com intensidade variável e com menor mobilidade relativa (Figura 3A e B). A maioria das bandas correspondentes às observadas por SDS-PAGE foi detectada por *Western blot*, indicando que as bandas com menor mobilidade relativa correspondem a produtos de degradação gerados na *E. coli* ou durante o processamento das proteínas rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6. (Figura 3C e D).

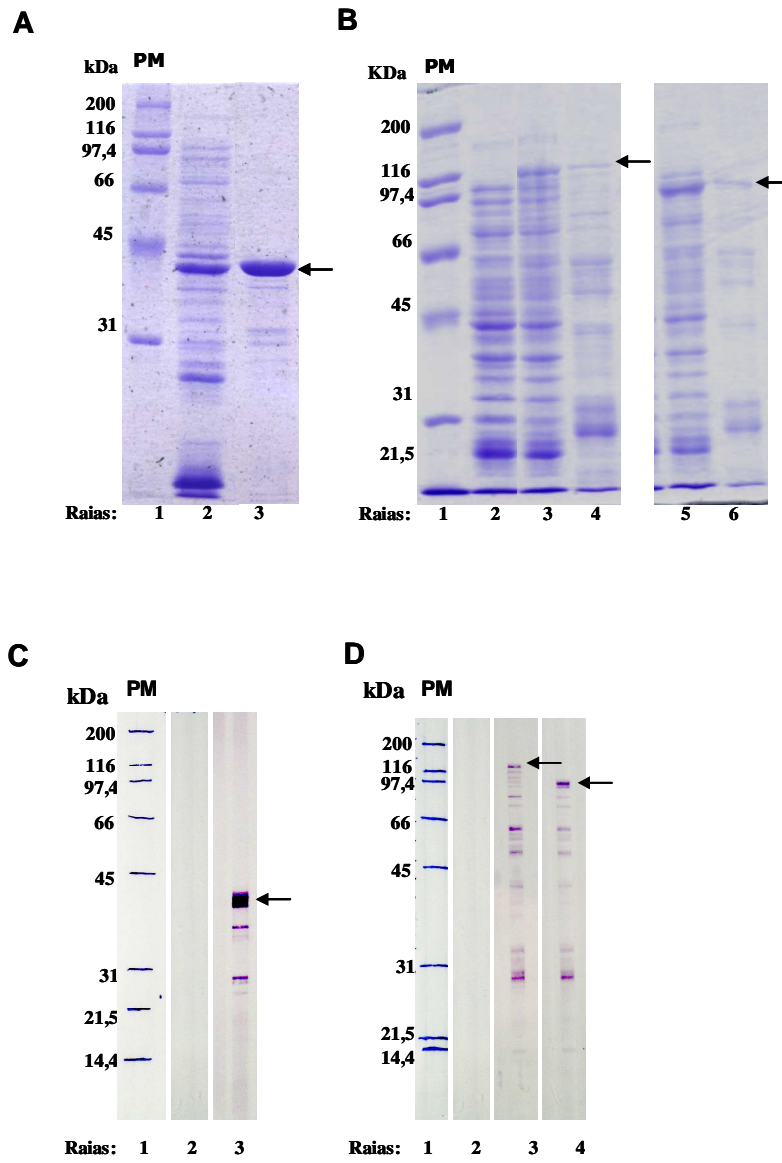


Figura 3. Avaliação por SDS-PAGE e Western blot dos fragmentos recombinantes de cinesina de *L. chagasi* purificados por cromatografia. Fragmentos recombinantes de cinesina purificados por cromatografia de afinidade e analisados por SDS-PAGE (A: gel a 12 % e B: gel a 10 %) e *western blot* (C e D). Avaliação da purificação por SDS-PAGE: A) marcador de peso molecular (raia 1), amostra de cultivo de BL21(DE3)pLysS-*pRSET-Lci2B-NH6* após 3 h de indução com IPTG (raia 2) e amostra de *rLci2B-NH6* purificada (raia 3); B) marcador de peso molecular (raia 1), amostra de cultivo de BL21(DE3)pLysS-*pRSET-vazio* (raia 2) ou BL21(DE3)pLysS-*pRSET-Lci2-NT-5R-CT-NH6* (raia 3) após 3 h de indução com IPTG, amostra de *rLci2-NT-5R-CT-NH6* purificada (raia 4), amostra de cultivo de BL21(DE3)pLysS-*pRSET-Lci2-NT-CT-NH6* após 3 h de indução com IPTG (raia 5) e amostra de *rLci2-NT-CT-NH6* purificada (raia 6). *rLci2-NT-CT-NH6* e *rLci2-NT-5R-CT-NH6* purificadas estão parcialmente degradadas. C e D, Avaliação da purificação por *western blot* com anticorpo de camundongo anti-histidina conjugado a fosfatase alcalina (anti-His-fa), conforme descrito na secção de material e métodos, C: marcador de peso molecular (raia 1), BL21(DE3)pLysS-*prset-vazio* (raia 2), *rLci2B-NH6* purificada (raia 3), D: marcador de peso molecular (raia 1), BL21(DE3)pLysS-*prset-vazio* (raia 2), *rLci2-NT-5R-CT-NH6* purificada (raia 3) e *rLci2-NT-CT-NH6* purificada (raia 4). As setas indicam as proteínas intactas. Notar a existência de várias bandas com menor mobilidade relativa que *rLci2-NT-5R-CT-NH6* e *rLci2-NT-CT-NH6* intactas nas raias 3 e 4 reveladas com anti-His-fa, respectivamente. Na imagem do *western blot* foi realizado um ajuste de contraste no Adobe Photoshop versão 6.

5.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram purificados a partir de *E. coli* TOP10 transformadas com pcDNA3.1-scmu-IL-12, pcDNA3.1-mu-IL-2 ou pcDNA3.1-vazio através do método de lise alcalina e cromatografia de troca iônica (Qiagen). Os plasmídeos pcDNA3.1-scmu-IL-12, pcDNA3.1-mu-IL-2 ou pcDNA3.1-vazio purificados e solubilizados em salina apresentaram concentrações de DNA e LPS: 2.569 μ g/ μ L e 8,5 EU/mL; 1.805 μ g/ μ L e 3,5 EU/mL; e 2.140 μ g/ μ L e 1,1 EU/mL, respectivamente. Os resultados da proporção da leitura óptica a 260/280 nm mostraram-se superiores a 1,8, sugerindo baixa concentração de contaminantes protéicos e um grau de pureza satisfatório. Para avaliar a integridade e o grau de pureza das preparações plasmídeais, amostras dos plasmídeos foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (Figura 4). O gel de agarose mostra nas raiais correspondentes à aplicação de pcDNA3.1-scmu-IL-12, pcDNA3.1-mu-IL-2 ou pcDNA3.1-vazio, duas bandas de DNA, uma compatível com moléculas únicas de plasmídeo super-espíralado (banda mais baixa) e outra compatível com moléculas de concatâmeros de plasmídeo (banda mais alta) figura 4 . Além disso, somente na raia correspondente a aplicação de pcDNA3.1-vazio, observa-se, ainda, uma terceira banda com intensidade mais fraca que as descritas previamente. Esta banda provavelmente representa moléculas de plasmídeo com uma das duas fitas de DNA cortada.

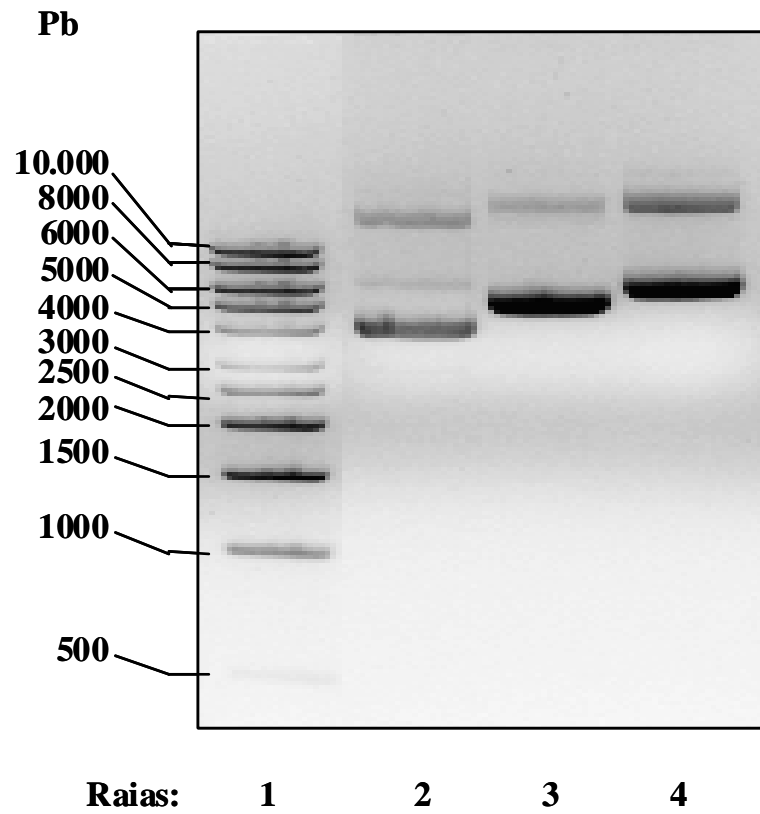


Figura 4. Avaliação da pureza e integridade dos plasmídeos por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio. Raias: 1) marcadores de peso molecular, 2) 200 μ g de pcDNA3.1-vazio, 3) 200 μ g de pcDNA3.1-mu-IL-2 e 4) 200 μ g pcDNA 3.1-scmu-IL-12.

5.3 RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM rLci2B-NH6 E SAPONINA EM COMBINAÇÃO COM pcDNA3.1-scmu-IL-12 E/OU pcDNA3.1-mu-IL-2

Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, observou-se que camundongos BALB/c imunizados com rLci2B-NH6 e saponina apresentavam resposta imune específica mista (Th1/Th2) e que a administração simultânea de pcDNA3.1-scmu-IL-12 não resultava no estabelecimento de resposta predominantemente ou exclusivamente do tipo Th1. Como IL-2 exibe sinergia com IL-12 na produção de IFN- γ , que poderia favorecer a indução de resposta imune do tipo Th1 a antígenos co-administrados, no presente trabalho, a resposta imune de camundongos injetados com rLci2B-NH6/ saponina/ pcDNA3.1-scmu-IL-12 e pcDNA3.1-mu-IL-2 foi avaliada.

5.3.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A resposta imune humoral foi avaliada em amostras de soro obtidas 10 dias após a terceira dose de imunização. As amostras de soro foram avaliadas nas diluições de 1:50.000, 1:150.000 e 1:150.000, para a mensuração de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1, respectivamente.

O grupo de camundongos injetados com salina (G1, controle negativo) exibiu baixos valores de densidade óptica (DO) em ELISA para mensuração de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1: ($X \pm SD$) $0,077 \pm 0,045$; $0,100 \pm 0,073$ e $0,135 \pm 0,175$, respectivamente. Os outros grupos controles, constituídos por camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina (G2, DO: $0,989 \pm 0,100$; $1,834 \pm 0,111$ e $1,986 \pm 0,080$), rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1 vazio (G3, DO: $1,085 \pm 0,380$; $1,776 \pm 0,056$ e $1,996 \pm 0,060$), rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-2/pcDNA3.1 vazio (G4, DO: $1,073 \pm 0,245$; $1,739 \pm 0,094$ e $1,950 \pm 0,050$) ou rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1 vazio (G5, DO: $1,001 \pm 0,194$; $1,808 \pm 0,119$ e $1,981 \pm 0,049$), apresentaram valores significativamente mais altos de DO ($p < 0,001$), indicando que animais dos grupos G2, G3, G4 e G5 produziram anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 reativos à rLci2B-NH6 (Figura 5). O grupo de animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1-mu-IL-2 revelou valores de DO correspondentes a mensuração de anticorpos

da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 (DO: $0,888 \pm 0,136$; $1,828 \pm 0,097$ e $1,934 \pm 0,079$, Figura 5) semelhantes aos grupos de camundongos controles injetados rLci2-NH6/saponina em associação ou não com plasmídeo (G2, G3, G4 e G5, $p > 0,001$).

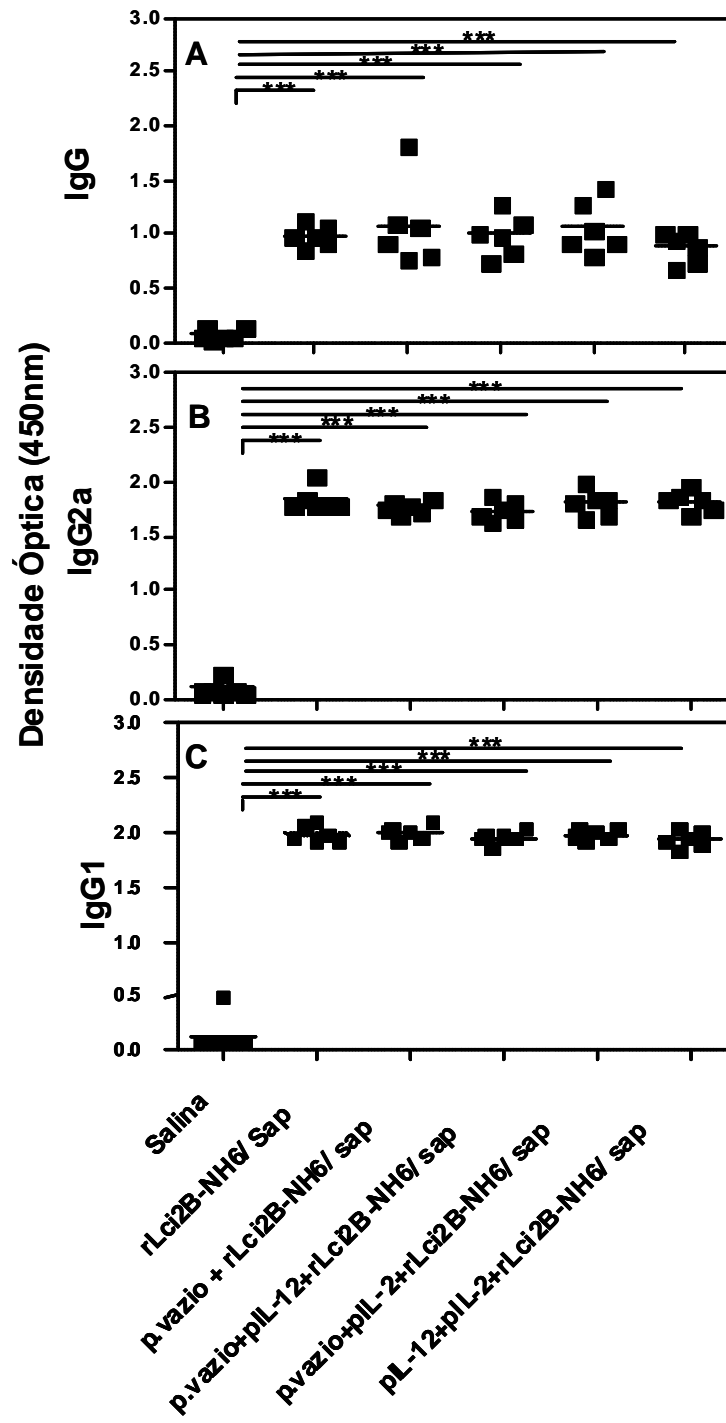


Figura 5. Avaliação de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1 específicos em camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina e plasmídeos codificando IL-12 e IL-2 murinas. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas. Na primeira dose um grupo de animais foi injetado com salina (G1) e 5 grupos foram injetados com 100 µg de rLci2B-NH6 e 100 µg de saponina (rLci2B-NH6 /saponina) por via subcutânea. Os grupos de camundongos foram imunizados com rLci2B-NH6/saponina também foram injetados 100 µg de pcDNA3.1 vazio (G3), 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-2 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio (G4), 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio (G5) ou 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1-mu-IL-2 (G6), por via muscular na região do quadriceps. Em seguida, foi realizada eletroporação na região do quadriceps conforme descrito em Material e métodos. Na segunda e terceira doses foram realizadas a injeções de salina (G1) ou rLci2B-NH6/saponina (G2, G3, G4, G5 e G6) por via subcutânea. Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados poços de placas de microtitulação sensibilizadas com rLci2B-NH6, amostras de soro coletadas 10 dias após a última dose imunização diluídas de 1:50.000 (para IgG) 1:150.000 (para IgG2a e IgG1). *** $p < 0,001$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética dos valores.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

A resposta imune celular foi avaliada através de ensaio de linfoproliferação e mensuração da concentração de citocinas (IFN- γ e IL-5) em sobrenadantes de esplenócitos obtidos 4 semanas após a terceira dose de imunização. Para os ensaios de linfoproliferação, os esplenócitos foram estimulados *in vitro* por 3 dias com Con A a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ou 5 dias com antígenos do lisado de formas amastigotas axênicas de *L. chagasi* ou rLci2B-NH6, ambos a 10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que, para a mensuração das citocinas os esplenócitos foram estimulados por 48 h.

5.3.2.1 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

O grupo de camundongos injetados com salina apresentou uma alta média de índice de proliferação (IP) de esplenócitos, com considerável variação dos valores de animal para animal dentro do mesmo grupo, quando estimulados *in vitro* com Con A ($X \pm SD$ 180,3 \pm 126,2). Por outro lado, esse grupo de camundongos revelou baixos IP de esplenócitos estimulados com lisado de *L. chagasi* (4,2 \pm 2,6) ou rLci2B-NH6 (4,3 \pm 1,2) (Figura 6). Os grupos de camundongos controles imunizados com rLci2B-NH6/saponina, rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1 vazio, rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-2/pcDNA3.1 vazio, rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1 vazio e rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1-mu-IL-2, apresentaram valores de IP de esplenócitos estimulados com Con A, 56,9 \pm 44,5; 73,1 \pm 54,1; 65,2 \pm 71,4; 42,9 \pm 32,7 e 103,4 \pm 67,4; respectivamente. A comparação estatística mostrou a média de IP do grupo rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1 vazio foi menor que a do grupo salina (ANOVA e pós-teste de Tukey $p < 0,05$) (Figura 6). Em relação à resposta linfoproliferativa específica para estimulação *in vitro* com lisado de *L. chagasi*, observou-se que os grupos de camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina em associação ou não com plasmídeo (G2, G3, G4 e G5) revelaram média de valores de IP semelhantes (variando de 0,96 a 1,6 vezes) a do grupo salina. Já o grupo que recebeu rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1-mu-IL-2 (G6, IP: 12,2 \pm 7,5) que exibiu um valor 2,4 e 2,5 vezes maior e significativamente diferente da média do grupo G1 e G2, respectivamente (ANOVA e pós-teste de Tukey $p < 0,05$) (Figura 6). Além disso, os IP

relacionados à resposta linfoproliferativa conseqüentes à estimulação *in vitro* com rLci2B-NH6 variaram nos grupos G2 ($14,9 \pm 9,2$), G3 ($20,0 \pm 13,2$), G4 ($15,3 \pm 10,6$) e G5 ($20,3 \pm 14,2$) de 3,5 a 4,7 vezes com relação ao valor de IP grupos salina, porém não diferiram estaticamente, provavelmente, devido à variação dos valores individuais em cada um desses grupos. Novamente, a média do valor de IP do grupo imunizado com rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-mu-IL-12/pcDNA3.1-mu-IL-2 ($X \pm SD: 38,1 \pm 25,5$) foi tanto maior que a do grupo salina (8,8 vezes) quanto maior que a dos outros grupos de camundongos (ANOVA e pós-teste de Tukey $**p < 0,01$), Figura 6. No grupo G6 também foi observada uma grande variação dos valores individuais de IP.

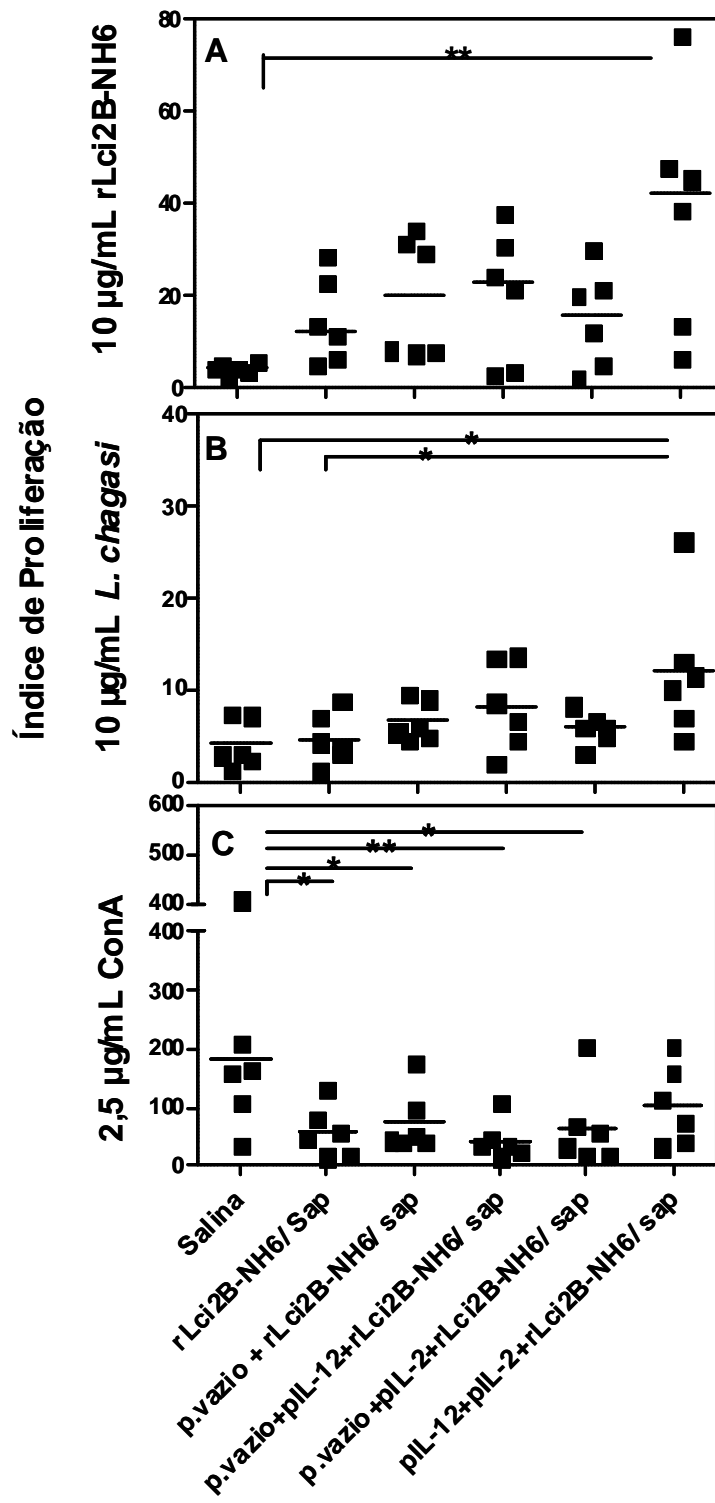


Figura 6. Avaliação da proliferação de esplenócitos estimulados *in vitro* com Con A, lisado de *L. chagasi* ou rLci2B-NH6 em camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina e plasmídeos codificando IL-12 e IL-2 murinas. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas. Na primeira dose um grupo de animais foi injetado com salina (G1) e 5 grupos foram injetados com 100 µg de rLci2B-NH6 e 100 µg de saponina (rLci2B-NH6 /saponina) por via subcutânea. Os grupos de camundongos foram imunizados com rLci2B-NH6/saponina também foram injetados 100 µg de pcDNA3.1 vazio (G3), 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-2 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio (G4), 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1 vazio (G5) ou 50 µg pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 µg de pcDNA3.1-mu-IL-2 (G6), por via muscular na região do quadriceps. Em seguida foi realizada eletroporação na região do quadriceps conforme descrito em Material e métodos. Na segunda e terceira doses foram realizadas as injeções de salina (G1) ou rLci2B-NH6/saponina (G2, G3, G4, G5 e G6) por via subcutânea. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a 3×10^5 /poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* com Con A a 2,5 µg/mL (por 3 dias), lisado de *L. chagasi* ou rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (por 5 dias). Dezoito horas antes da coleta das células, cada poço foi pulsado com 1 µCi de timidina [H]3+. Os valores são mostrados com índice de proliferação. **p<0,01 (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética dos valores.

5.3.2.2 PRODUÇÃO DE IL-5 E IFN- γ

O grupo de camundongos injetados com salina revelou a produção de IFN- γ e IL-5 no sobrenadante de esplenócitos cultivados na presença de Con A e rLci2B-NH6. Os valores de concentração ($X \pm SD$) foram de $12,98 \pm 5,91$ e $2,23 \pm 4,53$ ng/mL para IFN- γ e $0,14 \pm 0,11$ e $0,07 \pm 0,00$ ng/mL para IL-5, respectivamente (Figura 7). Quando estimulados *in vitro* com Con A, esplenócitos dos grupos de camundongos imunizados com rLci2B-NH6 em associação ou não com plasmídeo geraram sobrenadantes com concentrações variáveis de IFN- γ e IL-5 (G2: $18,30 \pm 11,97$ e $0,48 \pm 0,22$, G3: $18,32 \pm 7,48$ e $0,48 \pm 0,15$, G4: $18,31 \pm 12,19$ e $0,42 \pm 0,20$, G5: $16,61 \pm 8,63$ e $0,49 \pm 0,23$ e G6: $11,61 \pm 7,04$ e $0,38 \pm 0,32$ ng/mL). As comparações estatísticas não revelaram qualquer diferença, seja na concentração de IFN- γ ou na concentração de IL-5, entre os grupos de camundongos, apesar de ter sido observado uma tendência nos valores maiores para IL-5 nos grupos imunizados (G2, G3, G4, G5 e G6) (Figura 7). As concentrações de IFN γ e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6 nos grupos de camundongos imunizados foram: (G2: $9,51 \pm 11,50$ e $0,63 \pm 0,39$, G3: $4,63 \pm 4,86$ e $0,69 \pm 0,48$, G4: $7,21 \pm 8,33$ e $0,65 \pm 0,43$, G5: $11,28 \pm 19,34$ e $0,89 \pm 0,66$ e G6: $5,46 \pm 10,20$ e $0,49 \pm 0,47$ ng/mL) foram bastante variáveis, em especial para a última citocina, Figura 7. Os valores de concentração de IFN- γ e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos estimulados *in vitro* com lisado de *L. chagasi* ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio (dados não mostrados).

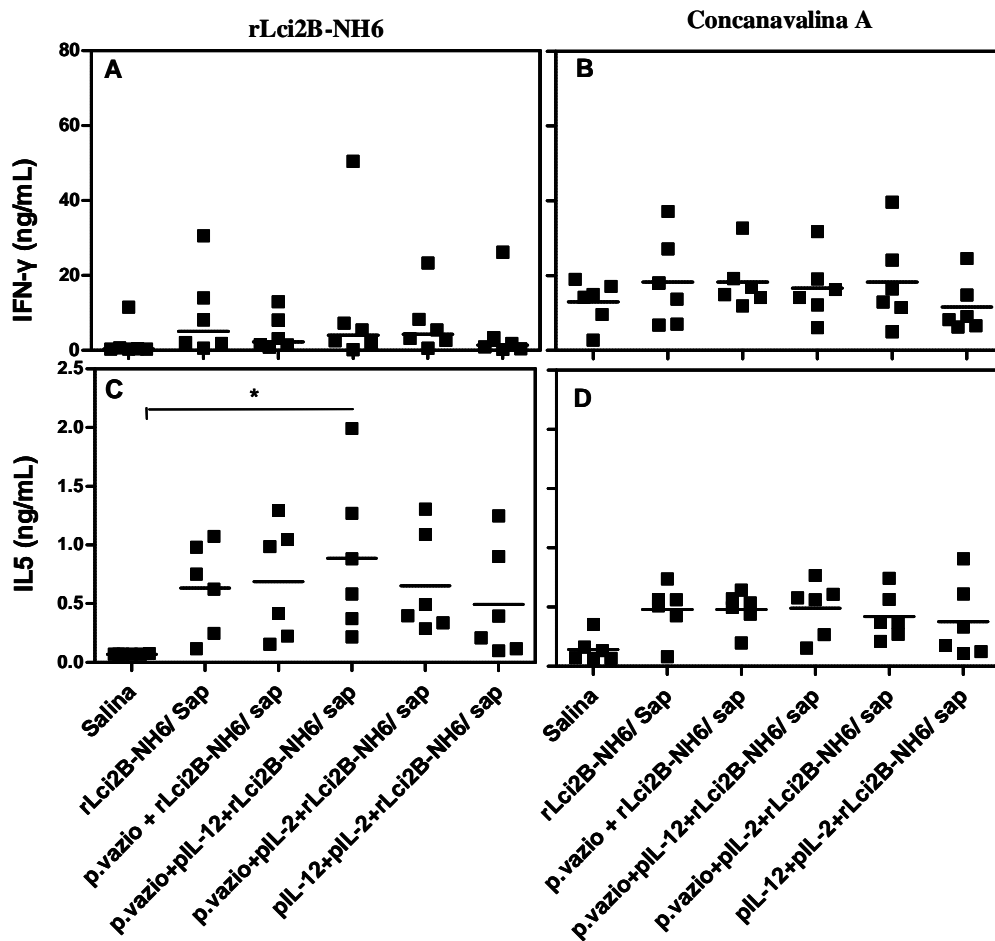


Figura 7. Avaliação da produção de IFN- γ (A e B) e IL-5 (C e D) por esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6 (A e C) ou Con A (B e D) em camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina e plasmídeos codificando IL-12 e IL-2 murinas. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas. Na primeira dose um grupo de animais foi injetado com salina (G1) e 5 grupos foram injetados com 100 μ g de rLci2B-NH6 e 100 μ g de saponina (rLci2B-NH6 /saponina) por via subcutânea. Os grupos de camundongos foram imunizados com rLci2B-NH6/saponina também foram injetados 100 μ g de pcDNA3.1 vazio (G3), 50 μ g pcDNA3.1-mu-IL-2 e 50 μ g de pcDNA3.1 vazio (G4), 50 μ g pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 μ g de pcDNA3.1 vazio (G5) ou 50 μ g pcDNA3.1-mu-IL-12 e 50 μ g de pcDNA3.1-mu-IL-2 (G6), por via muscular na região do quadriceps. Em seguida foi realizada eletroporação na região do quadriceps conforme descrito em Material e métodos. Na segunda e terceira doses foram realizadas a injeções de salina (G1) ou rLci2B-NH6/saponina (G2, G3, G4, G5 e G6) por via subcutânea. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a $9 \times 10^5/300 \mu$ L/poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* por 48 h com Con A a 2,5 μ g/mL ou rLci2B-NH6 a 10 μ g/mL. A concentração de IFN- γ e IL-5 foi realizada por ELISA de captura seguindo-se protocolo da Pharmingen. * $p < 0,05$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética.

5.4 RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS rLci2-NT-CT-NH6 E rLci2-NT-5R-CT-NH6

O antígeno rLci2B-NH6 é composto de ~5,5 domínios com motivos repetitivos de 39 AA seguidos por um domínio não repetitivo de 76 AA. Antígenos com domínios repetitivos, provavelmente, com maior frequência que antígenos sem domínios repetitivos, tendem a estimular e a usar linfócitos B como células apresentadoras de antígenos para células T CD4+, levando ao desenvolvimento de resposta imune específica Th2 em detrimento de resposta do tipo Th1. Por isso, na tentativa de induzir resposta imune Th1 a um antígeno recombinante de *L. chagasi*, usando-se informações do gene que codifica rLci2B, uma nova construção foi elaborada de modo a gerar um polipeptídico com domínio não repetitivo de 701 AA seguido do domínio não repetitivo de 76 AA (rLci2-NT-CT-NH6). Como controle, foi elaborada uma construção (rLci2-NT-5R-CT-NH6) onde entre os domínios não repetitivos foram introduzidos ~5,5 domínios com motivos repetitivos de rLci2B.

Conforme mencionado na secção de Material e Métodos, os grupos controles do experimento cujos resultados serão descritos a seguir, foram dois dos grupos usados no experimento realizado para examinar se a adição de pcDNA3.1-mu-IL-2 no processo de imunização com rLci2B-NH6/saponina/ pcDNA3.1-scmu-IL-12 promovia a indução de resposta imune do tipo Th1 (grupos G1 e G2). Dois camundongos do grupo injetado com rLci2-NT-CT-NH6/saponina foram encontrados mortos. Um deles 3 dias após a primeira e o outro 3 dias após a segunda dose de imunização.

5.4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

O grupo de camundongos injetados com salina apresentou valores baixos de DO correspondentes à mensuração de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 reativos aos antígenos rLci2B-NH6 ($X \pm SD$: $0,077 \pm 0,045$; $0,100 \pm 0,073$ e $0,135 \pm 0,175$), rLci2-NT-CT-NH6 ($0,043 \pm 0,001$; $0,080 \pm 0,016$ e $0,230 \pm 0,141$) e rLci2-NT-5R-CT-NH6 ($0,044 \pm 0,002$; $0,086 \pm 0,027$ e $0,114 \pm 0,024$), Figura 8. O grupo de camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina exibiu valores moderados e altos de DO relacionados a determinação da concentração de anti-rLci2B-NH6 da classe IgG ($0,989 \pm 0,100$) ou das subclasses IgG2a ($1,834 \pm 0,111$) e IgG1 ($1,986 \pm 0,080$), respectivamente, Figura 8. O grupo

imunizado com rLci2-NT-CT-NH6/saponina revelou valores moderados e altos de DO para anticorpos da classe IgG ($0,614 \pm 0,081$) ou subclasses IgG2a ($0,983 \pm 0,445$) e IgG1 ($1,789 \pm 0,019$) anti-rLci2-NT-CT-NH6, respectivamente, Figura 8. O grupo imunizado com rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina apresentou valores moderados e altos de DO para anticorpos da classe IgG ($0,732 \pm 0,152$) e subclasse IgG2a ($0,736 \pm 0,257$) ou IgG1 ($1,842 \pm 0,116$) anti-rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente, Figura 8. As proporções entre os valores obtidos para IgG2a/IgG1 foi de 0,92, para o grupo rLci2B-NH6/saponina, 0,55 para o grupo rLci2-NT-CT-NH6/saponina e 0,40 para o grupo rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina. Ocorreu variação moderada dos resultados individuais somente referente à produção de IgG2a nos grupos imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina e rLci2-NT-5R-CT-NH6/sap. A comparação estatística, quanto à produção de anticorpos específicos para as respectivas proteínas recombinantes, de cada um dos grupos imunizados apontou diferenças significantes com relação ao grupo salina (Teste T de Student não pareado: *** $p < 0,001$, Figura 8).

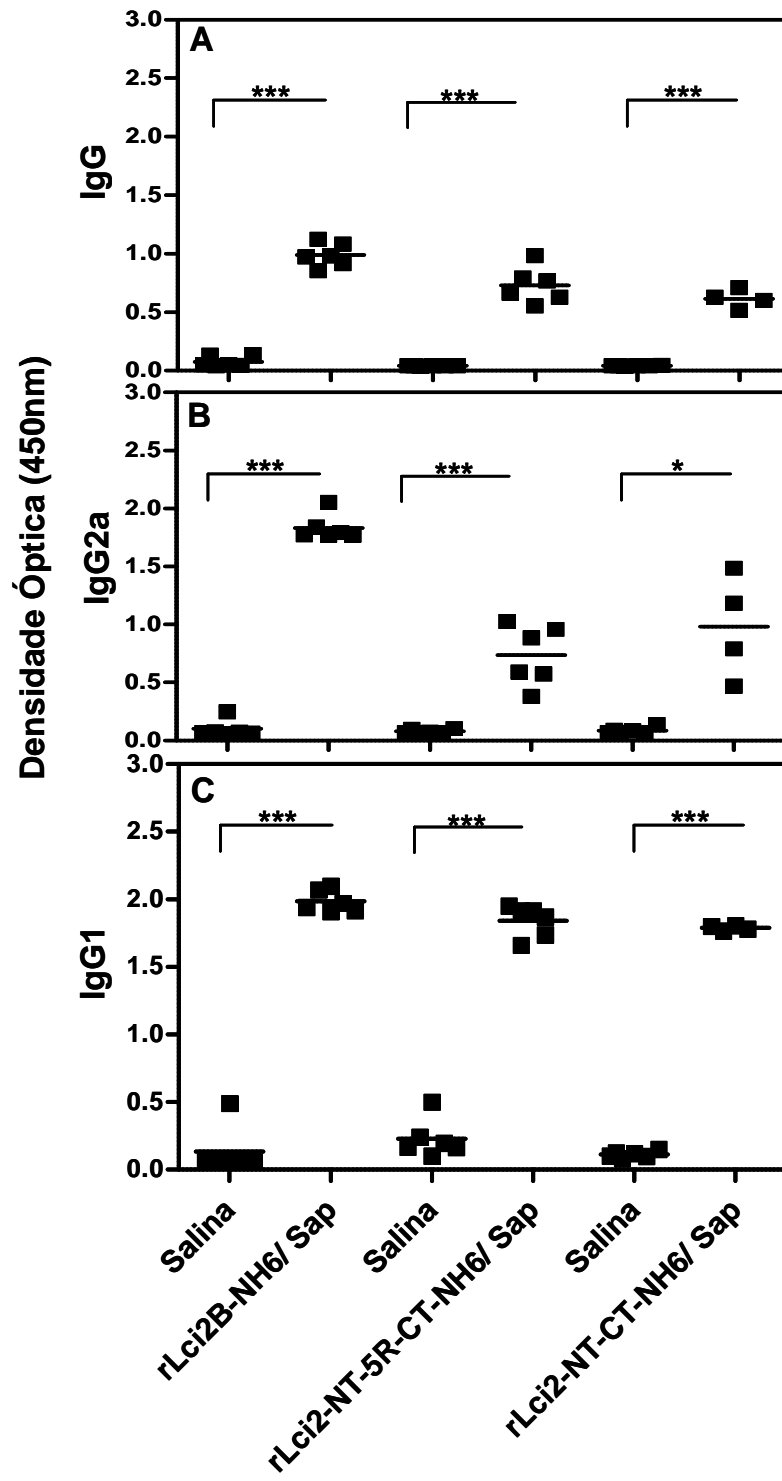


Figura 8. Avaliação de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1 específicos em camundongos imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina e rLci2-NT-5R-CT NH6/saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com 100 µg de rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 em combinação com 100 µg de saponina por via subcutânea. Os grupos G1 (salina) e G2 (rLci2B-NH6 /saponina) descritos nas Figuras 4, 5 e 6 foram usados como controles. Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados em poços de placas de microtitulação sensibilizadas com rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6. Amostras de soro coletadas 10 dias após a última dose imunização diluídas de 1:30.000 (para IgG) 1:32.000 (para IgG2a e IgG1). *** $p < 0,001$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética dos valores.

5.4.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

A resposta imune celular foi avaliada conforme descrito na secção de Material e Métodos e sumarizada na secção 5.3.2.

5.4.2.1 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Os resultados dos IP de esplenócitos cultivados com Con A, lisado de *L. chagasi* e rLci2B-NH6 dos grupos de camundongos controle injetados com salina ou rLci2B-NH6/saponina foram descritos na secção 5.3.2.1. Esplenócitos do grupo de camundongos injetados com salina mostraram baixos IP quando cultivados com tanto com rLci2-NT-CT-NH6 ($2,2 \pm 0,3$) quanto com rLci2-NT-5R-CT-NH6 ($2,6 \pm 1,3$) (Figura 9). O grupo de animais imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina e exibiu IP de esplenócitos estimulados *in vitro* com Con A, lisado de *L. chagasi* e rLci2-NT-CT-NH6 de $86,1 \pm 35,6$; $14,3 \pm 8,4$ e $35,9 \pm 14,3$ (Figura 9), respectivamente. Já os camundongos imunizados com rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina e apresentaram IP de $96,3 \pm 98,8$; $29,7 \pm 21,7$ e $29,7 \pm 21,7$ (Figura 9); quando os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com Con A, lisado de *L. chagasi* e rLci2-NT-5R-CT-NH6, respectivamente. Foram observadas variações dos resultados individuais de moderada a intensa dos IP nos grupos imunizados e do grupo salina quando os esplenócitos foram estimulados com Con A ou lisado de *L. chagasi*. Além disso, também foram notadas variações intensas dos valores individuais de IP nos grupos imunizados quando seus esplenócitos foram estimulados com as respectivas proteínas (Figura 9). A comparação estatística entre os grupos não mostrou diferença na proliferação de esplenócitos cultivados com Con A ou lisado de *L. chagasi* (ANOVA: $p > 0,05$), porém revelou diferenças entre cada grupo imunizado e o grupo salina, quando as células foram cultivadas com as respectivas proteínas recombinantes (Figura 9).

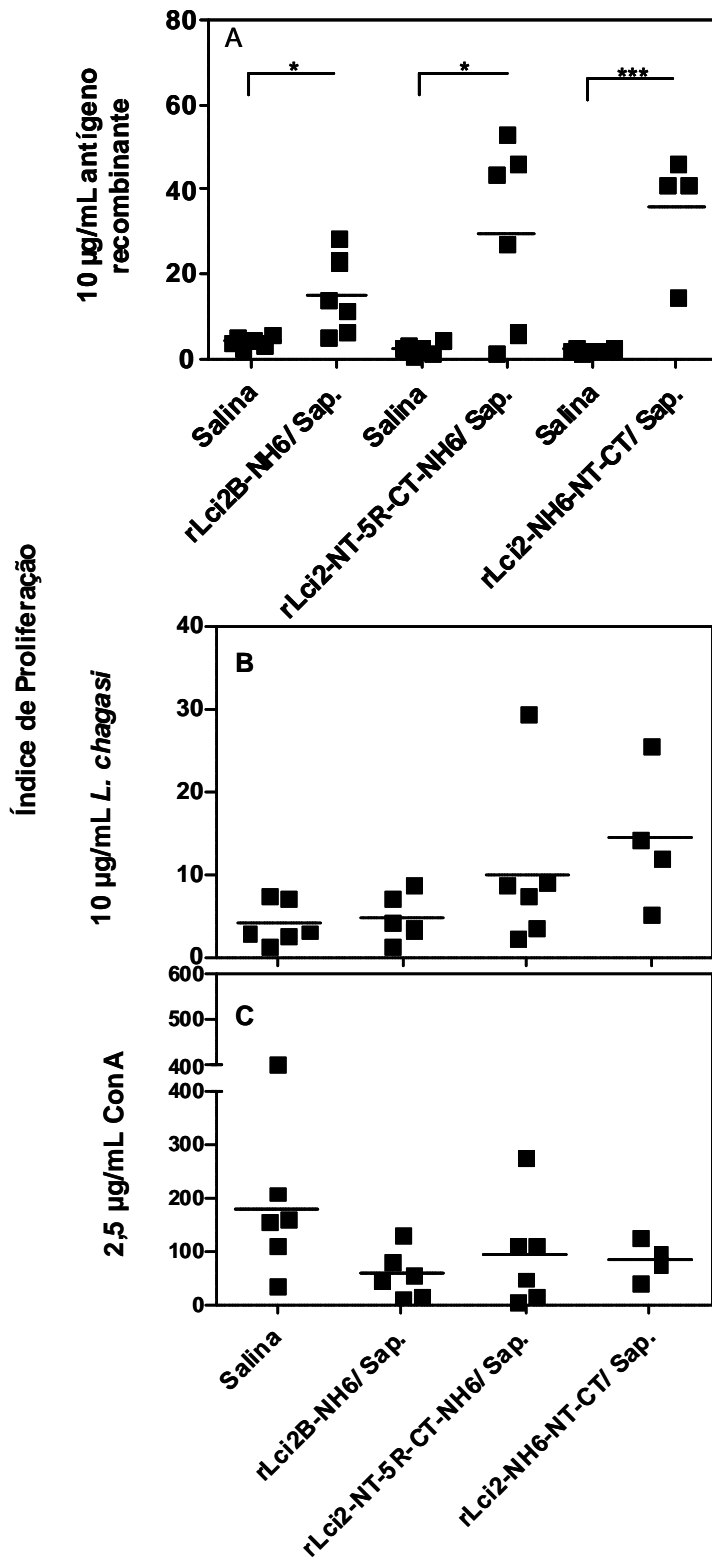


Figura 9. Avaliação da proliferação de esplenócitos estimulados *in vitro* com Con A, lisado de *L. chagasi* ou rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT NH6 em camundongos imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina e rLci2-NT-5R-CT NH6/saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com 100 µg de rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 em combinação com 100 µg de saponina por via subcutânea. Os grupos G1 (salina) e G2 (rLci2B-NH6 /saponina) descritos nas Figuras 4, 5 e 6 foram usados como controles. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a 3×10^5 /poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* com Con A a 2,5 µg/mL (por 3 dias), lisado de *L. chagasi*, rLci2-NT-CT-NH6, rLci2-NT-5R-CT-NH6 ou rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (por 5 dias). Dezoito horas antes da coleta das células, cada poço foi pulsado com 1 µCi de timidina [H]3+. Os valores são mostrados com índice de proliferação. * $p < 0,05$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética dos valores.

5.4.2.2 PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-5

Os resultados das concentrações de IFN- γ e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos cultivados com Con A, lisado de *L. chagasi* e rLci2B-NH6 dos grupos de camundongos injetados com salina ou rLci2B-NH6/saponina foram descritos na secção 5.3.2.2. O grupo de camundongos injetado com salina apresentou baixas concentrações de IFN- γ em sobrenadantes de esplenócitos cultivados com rLci2-NT-CT-NH6 ($0,51 \pm 0,24$) ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 ($0,36 \pm 0,11$). Sobrenadantes de esplenócitos dos grupos de animais imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina ou rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina mostraram alta concentração de IFN- γ em sobrenadantes de esplenócitos estimulados com Con A ($13,44 \pm 7,26$ e $15,36 \pm 12,40$ ng/mL) e baixa concentração de IFN- γ quando estimulados com as respectivas proteínas recombinantes (rLci2-NT-CT-NH6: $0,41 \pm 0,02$ ng/mL; rLci2-NT-5R-CT-NH6: $0,41 \pm 0,01$). O grupo de camundongos injetado com salina produziu baixa quantidade de IL-5 quando seus esplenócitos foram cultivados com rLci2-NT-CT-NH6 ($0,07 \pm 0,01$) e rLci2-NT-5R-CT-NH6 ($0,07 \pm 0,01$), respectivamente. Os grupos de camundongos imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina ou rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina revelaram moderada concentração de IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos estimulados com Con A ($0,598 \pm 0,352$ e $0,72 \pm 0,37$ ng/mL) ou baixa e moderada com as respectivas proteínas recombinantes (rLci2-NT-CT-NH6: $0,15 \pm 0,11$ ng/mL; rLci2-NT-5R-CT-NH6: $0,45 \pm 0,40$), respectivamente. Observou-se grande variação de valores individuais na produção de IFN- γ em todos os grupos de camundongos onde os esplenócitos foram estimulados com Con A e no grupo camundongos imunizado com rLci2B-NH6/saponina quando estimulados com a respectiva proteína recombinante. Notou-se também uma grande variação nos valores individuais de IL-5 nos grupos imunizados quando os esplenócitos foram estimulados com Con A e nos grupos rLci2B-NH6/saponina e rLci2-NT-CT-NH6/saponina quando estimulados com as respectivas proteínas. A comparação estatística entre os grupos mostrou uma maior produção de IL-5 entre o grupo imunizado com rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina e o grupo salina (ANOVA e pós-teste de Tukey: $**p < 0,01$, Figura 10). Além disso, também foi observada diferença significativa na produção de IL-5 nos grupos imunizados com rLci2B-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 quando os esplenócitos foram estimulados com as respectivas proteínas recombinante (teste T de Student: $p < 0,05$) (Figura 10).

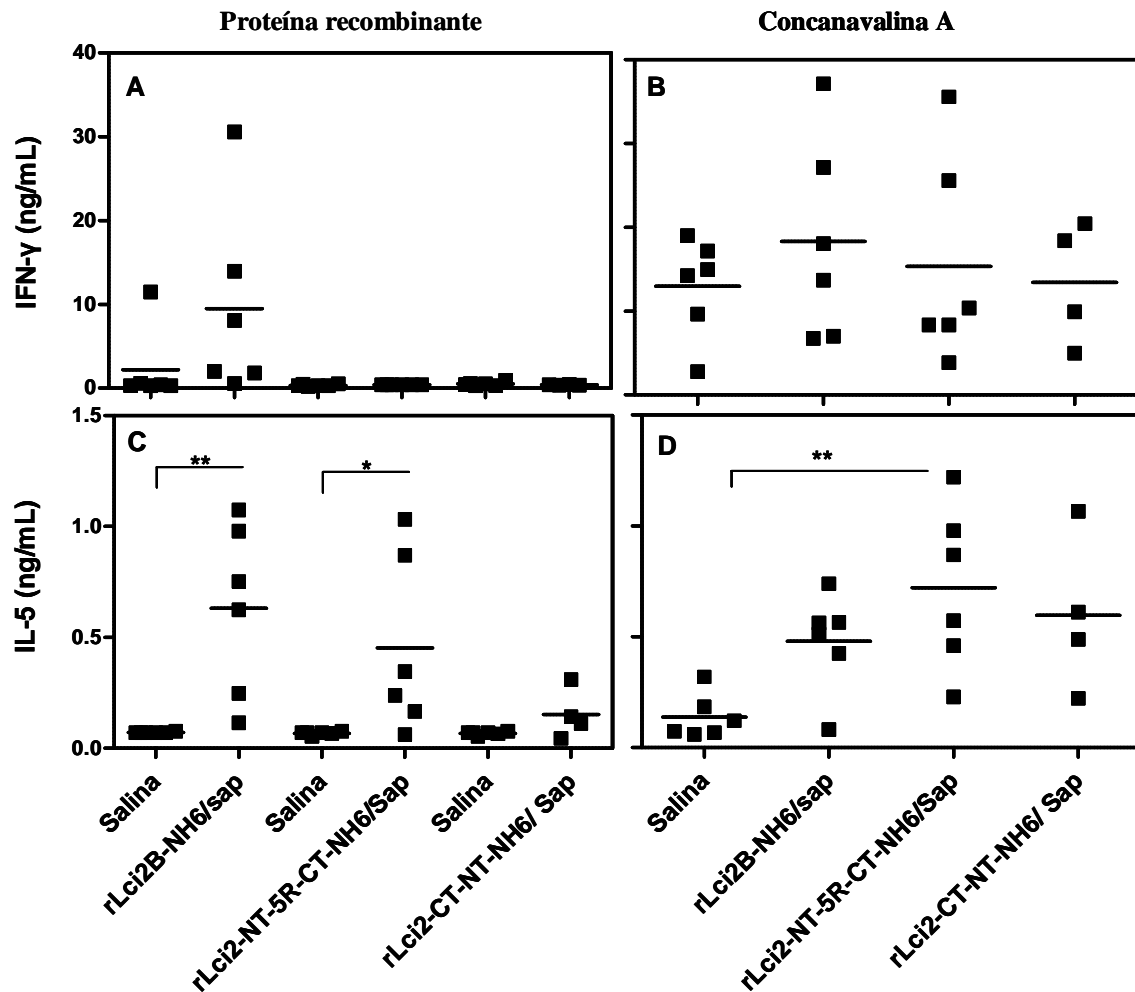


Figura 10. Avaliação da produção de IFN- γ (A e B) e IL-5 (C e D) por esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 (A e C) ou Con A (B e D) em camundongos imunizados com rLci2-NT-CT-NH6/saponina e rLci2-NT-5R-CT-NH6/saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com 100 μ g de rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 em combinação com 100 μ g de saponina por via subcutânea. Os grupos G1 (salina) e G2 (rLci2B-NH6 /saponina) descritos nas Figuras 4, 5 e 6 foram usados como controles. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a 3×10^5 /poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* por 48 h com Con A a 2,5 μ g/mL, lisado de *L. chagasi*, rLci2-NT-CT-NH6 ou rLci2-NT-5R-CT-NH6 rLci2B-NH6 a 10 μ g/mL. A concentração de IFN- γ e IL-5 foi realizada por ELISA de captura seguindo-se protocolo da Pharmingen. * $p < 0,01$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética.

5.5 RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM rLci2B-NH6 ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE SAPONINA.

Em nosso laboratório, durante a realização de vários experimentos, foi observada a morte de cerca de 2 para cada 40 camundongos BALB/c injetados 3 vezes, com intervalo de 21 dias entre duas doses consecutivas, com 100 µg de saponina por camundongo associada ou não com rLci2B-NH6. O problema é que, as vezes, as mortes observadas ocorrem, aparentemente fortuitamente, em um mesmo grupo experimental, acarretando uma dificuldade na análise estatística de resultados. Visando-se determinar se doses menores de saponina seriam capazes de contribuir para o desenvolvimento de resposta imune a antígenos co-administrados no mesmo grau de magnitude que 100 µg/dose, para no futuro avaliarem-se se doses menores de saponina correlacionam-se com a redução de mortalidade, no experimento cujos resultados são descritos a seguir, foram avaliadas a administração de 50 ou 25 µg/dose de saponina em associação com rLci2B-NH6 em camundongos BALB/c. Dois camundongos do grupo injetado com 100 µg foram encontrados mortos 3 dias após a primeira e 3 dias após a segunda dose de imunização e um camundongo do grupo que recebeu 25 µg foi encontrado morto 4 dias após a terceira dose de imunização.

5.5.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A avaliação da resposta imune humoral foi realizada conforme método descrito na secção de Material e Métodos e de maneira semelhante à sumarizada no primeiro parágrafo das secção 5.3.1.

O grupo de camundongos injetados com PBS apresentou valores de DO ($X \pm SD$) correspondentes à mensuração de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 específicos para rLci2B-NH6 de $0,046 \pm 0,003$; $0,056 \pm 0,057$ e $0,100 \pm 0,024$, respectivamente (Figura 11). Os grupos de camundongos imunizados com a proteína rLci2B-NH6 em combinação com saponina a 100 µg, 50 µg ou 25 µg por dose exibiram valores significativamente mais elevados de DO nos ensaios para determinação da concentração de anticorpos da classe IgG ($0,828 \pm 0,094$; $0,878 \pm 0,267$ e $1,593 \pm 0,131$) e das subclasses IgG2a ($0,882 \pm 0,060$; $0,994 \pm 0,198$ e $1,589 \pm 0,159$) e IgG1 ($0,740 \pm 0,128$; $0,879 \pm 0,174$ e

1,456 \pm 0,096) reativos a rLci2B-NH6, em comparação com o grupo injetado com PBS (ANOVA e pós-teste de Tukey, ***p<0,001) (Figura 11). A comparação estatística entre os grupos que receberam rLci2B-NH6/saponina não revelou diferença significativa.

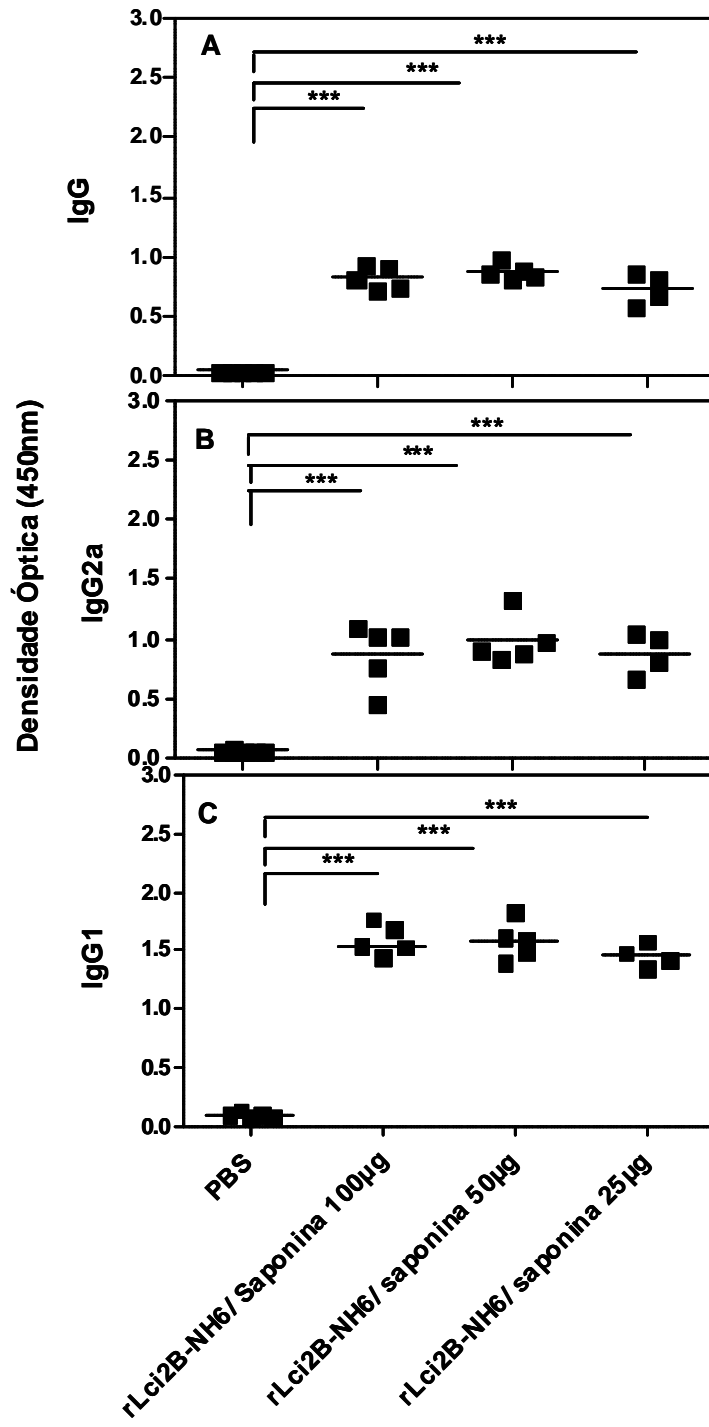


Figura 11. Avaliação de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1 específicos em camundongos imunizados com rLci2B-NH6 e diferentes doses de saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com PBS ou 100 µg de rLci2B-NH6 em combinação com 100, 50 ou 25 µg de saponina por via subcutânea. Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados poços de placas de microtitulação sensibilizadas com rLci2B-NH6, amostras de soro coletadas 10 dias após a última dose imunização diluídas de 1:50.000 (para IgG) 1:150.000 (para IgG2a e IgG1). *** $p < 0,001$ (ANOVA e pós-teste de Tukey) Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética.

5.5.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

A avaliação da resposta imune celular foi realizada conforme a descrição feita em Material e Métodos e de maneira semelhante à sumarizada no primeiro parágrafo das secções 5.3.2.

5.5.2.1 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

O grupo de camundongos injetados com PBS apresentou um valor moderado de índice de proliferação (IP) de esplenócitos com um algum grau de variação entre valores individuais dentro do grupo, quando estimulados *in vitro* com Con A ($X \pm SD$: $33,8 \pm 17,6$). Além disso, o grupo de camundongos injetado com PBS revelou valores baixos de IP de esplenócitos estimulados *in vitro* com lisado de *L. chagasi* ($3,2 \pm 1,5$) ou rLci2B-NH6 ($2,6 \pm 0,7$) (Figura 12).

Os grupos de animais imunizados com rLci2B-NH6/saponina quando estimulados com Con A, lisado de *L. chagasi* e rLci2B-NH6, respectivamente revelaram valores de IP de esplenócitos de $16,5 \pm 6,6$; $3,8 \pm 2,6$ e $6,2 \pm 5,5$ para o grupo de 100 μg de saponina/dose, $38,5 \pm 38,0$; $3,5 \pm 0,4$ e $13,6 \pm 12,6$ para o grupo de 50 μg de saponina/dose e $54,5 \pm 26,9$; $2,6 \pm 0,9$ e $20,1 \pm 12,2$ para o grupo de 25 μg de saponina/dose (Figura 12). Uma variação de moderada a intensa de IP dentro dos grupos foi observada no grupo 100 μg de saponina/dose pela estimulação com rLci2B-NH6 e nos grupo 50 μg de saponina/dose e 25 μg de saponina/dose, em ambos, pela estimulação com Con A ou rLci2B-NH6. A comparação estatística das médias de índice de proliferação mostrou diferença significativa somente entre o grupo PBS e o grupo de 25 μg de saponina quando a estimulação foi realizada com rLci2B-NH6 (ANOVA e pós-teste de Tukey: $p < 0,05$, Figura 12).

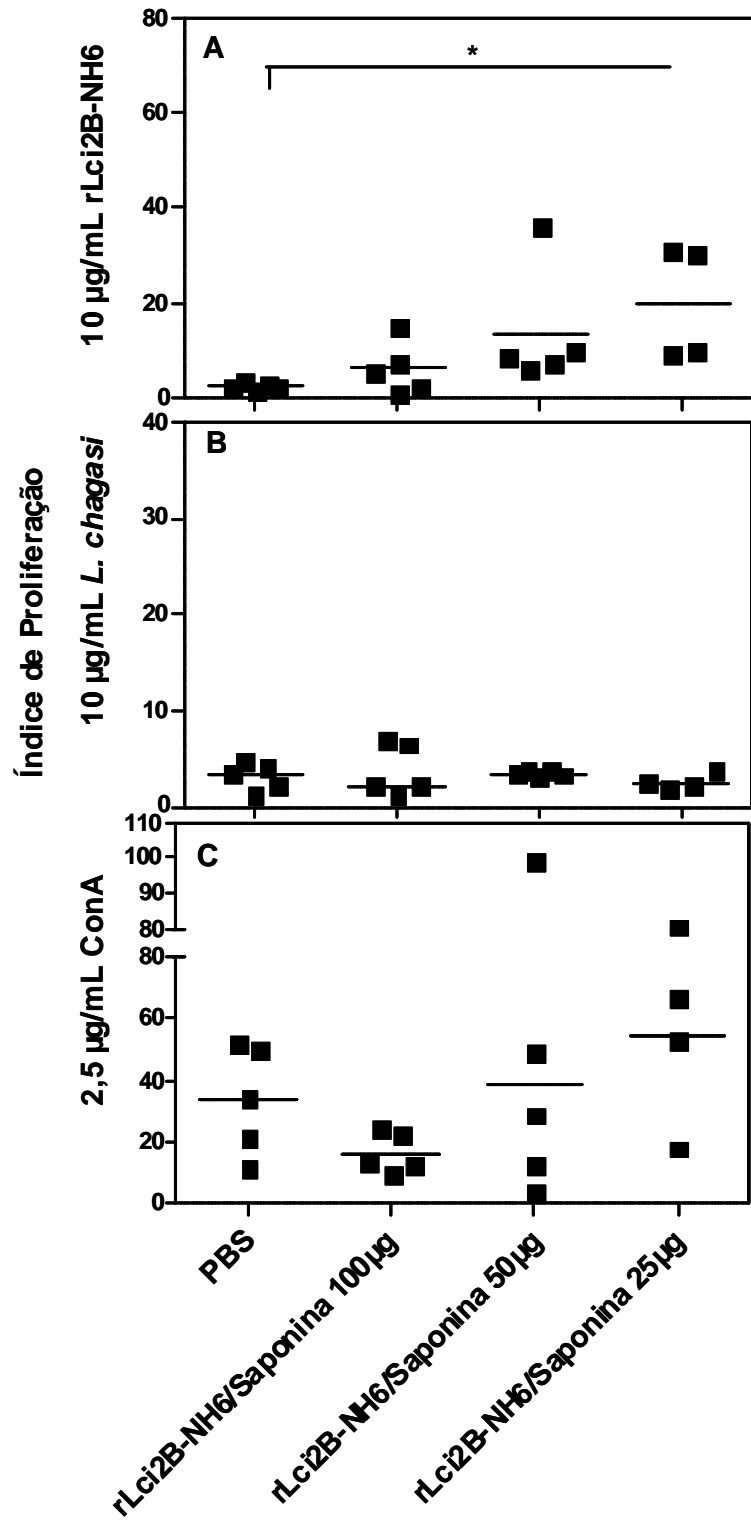


Figura 12. Avaliação da proliferação de esplenócitos estimulados *in vitro* com Con A, lisado de *L. chagasi* ou rLci2B-NH6 em camundongos imunizados com rLci2B-NH6 e diferentes doses de saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com PBS ou 100 µg de rLci2B-NH6 em combinação com 100, 50 ou 25 µg de saponina por via subcutânea. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a 3×10^5 /poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* com Con A a 2,5 µg/mL (por 3 dias), lisado de *L. chagasi*, rLci2B-NH6 a 10 µg/mL (por 5 dias). Dezoito horas antes da coleta das células, cada poço foi pulsado com 1 µCi de timidina [H]3+. Os valores são mostrados com índice de proliferação. * $p < 0,05$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética.

5.5.2.2 PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-5

O grupo de camundongos injetados com PBS exibiu uma concentração de IFN- γ alta quando os esplenócitos foram cultivados na presença de Con A ($X \pm SD$: $39,50 \pm 5,55$ ng/mL) e baixa quando as células foram cultivadas na presença rLci2B-NH6 ($0,79 \pm 0,89$). Esse grupo de animais apresentou uma baixa concentração de IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos cultivados com Con A ($0,15 \pm 0,11$ ng/mL) ou rLci2B-NH6 ($0,03 \pm 0,00$ ng/mL). Os grupos de camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina revelaram média de concentração IFN- γ e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos progressivamente menores tanto estimulados por Con A quanto estimulados com rLci2B-NH6, sendo maiores os valores no grupo de 100 μ g de saponina/dose (Con A/IFN- γ : $36,48 \pm 17,58$; rLci2B-NH6/IFN- γ : $25,24 \pm 4,28$; Con A/IL-5: $0,38 \pm 0,22$ e rLci2B-NH6/IL-5: $0,82 \pm 0,48$ ng/ml), intermediários no grupo de 50 μ g de saponina/dose (Con A/IFN- γ : $29,44 \pm 14,36$; rLci2B-NH6/IFN- γ : $18,94 \pm 9,93$; Con A/IL-5: $0,27 \pm 0,14$ e rLci2B-NH6/IL-5: $0,35 \pm 0,16$ ng/ml) e menores no grupo de 25 μ g de saponina/dose (Con A/IFN- γ : $21,13 \pm 12,24$; rLci2B-NH6/IFN- γ : $6,41 \pm 7,21$; Con A/IL-5: $0,25 \pm 0,06$ e rLci2B-NH6/IL-5: $0,20 \pm 0,08$ ng/ml). Observou-se variação moderada a intensa dos valores individuais da concentração de IFN- γ em todos os grupos que receberam saponina quando os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com Con A e no grupo de 50 μ g de saponina/dose quando os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6. Também foi observada variação intensa dos valores individuais da concentração de IL-5 no grupo de 100 μ g de saponina/dose quando os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6. A comparação estatística entre as médias da concentração das citocinas mostrou que os grupos 100 μ g e 50 μ g de saponina/dose produziram maior quantidade de IFN- γ do que os grupos PBS e 25 μ g de saponina/dose e o 100 μ g de saponina/dose sintetizou maior quantidade de IL-5 do que os grupos PBS e 25 μ g de saponina/dose (ANOVA e pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 13). Os valores de concentração de IFN- γ e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos estimulados *in vitro* com lisado de *L. chagasi* ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio (dados não mostrados).

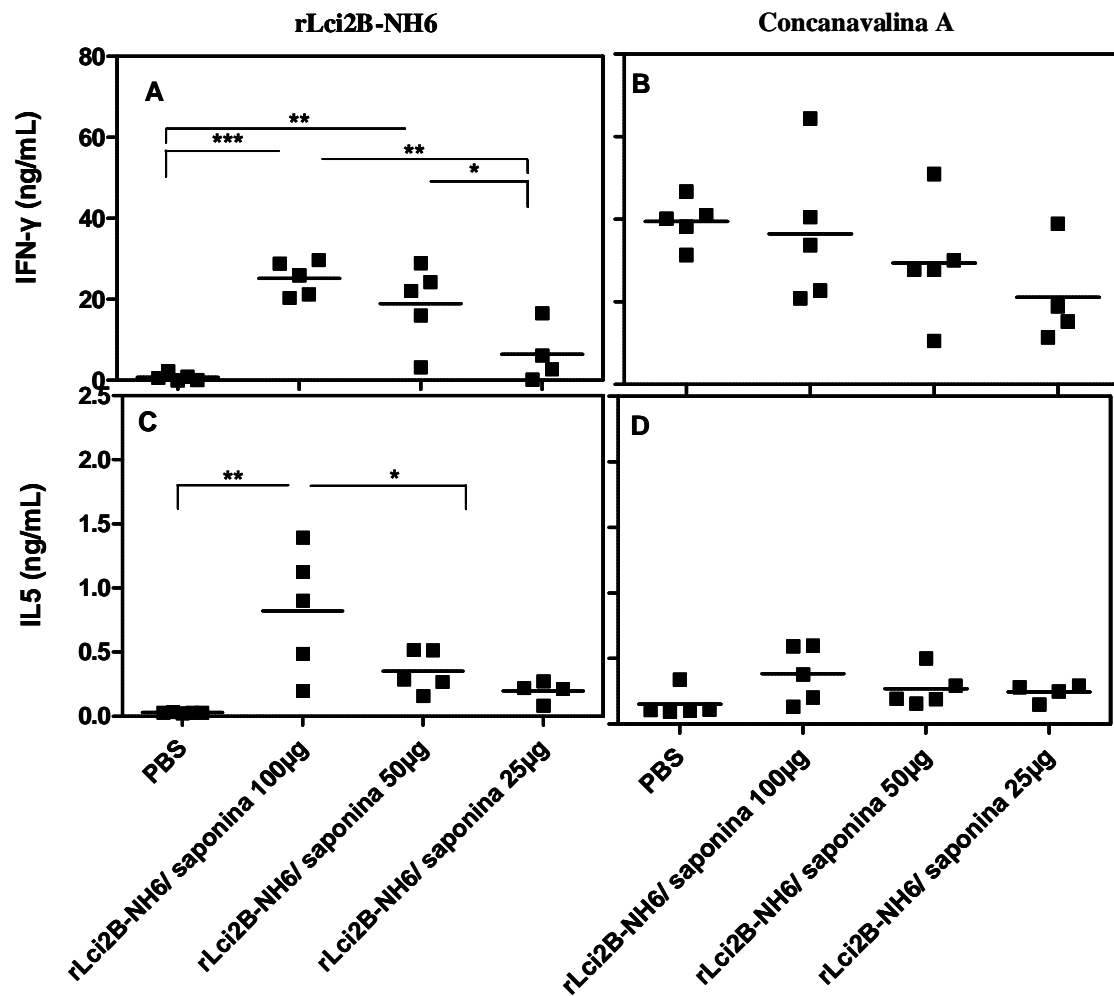


Figura 13. Avaliação da produção de IFN- γ (A e B) e IL-5 (C e D) por esplenócitos estimulados *in vitro* com rLci2B-NH6 (A e C) ou Con A (B e D) em camundongos imunizados com rLci2B-NH6 e diferentes doses de saponina. Grupos de 6 camundongos BALB/c foram injetados com 3 vezes, com intervalo de 3 semanas entre injeções consecutivas, com PBS ou 100 μ g de rLci2B-NH6 em combinação com 100, 50 ou 25 μ g de saponina por via subcutânea. Esplenócitos dos animais de cada grupo (usados a 3×10^5 /poço), obtidos após 4 semanas da última dose de imunização, foram estimulados *in vitro* por 48 h com Con A a 2,5 μ g/mL, lisado de *L. chagasi* ou rLci2B-NH6 a 10 μ g/mL. A concentração de IFN- γ e IL-5 foi realizada por ELISA de captura seguindo-se protocolo da Pharmingen. * $p < 0,05$ (ANOVA e pós-teste de Tukey). Os quadrados (■) representam valores individuais e as linhas (—) representam a média aritmética.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi avaliada a imunização de camundongos BALB/c com rLci2B-NH6 em combinação com saponina, pcDNA3.1-scmu-IL-12 AEL e pcDNA3.1-mu-IL-2 AEL ou com rLci2B-NH6 em combinação com diferentes doses de saponina (100, 50 ou 25 µg). Além disso, também foi avaliada a imunização de camundongos BALB/c com a proteína rLci2-NT-CT-NH6 em combinação com saponina.

A proteína recombinante rLci2B-NH6 representa o segmento da extremidade carboxila (CT) de uma cinesina da *Leishmania chagasi* (Burns et al., 1993; Gerald, et al., 2007, <http://www.genedb.org> código de acesso do gene LinJ14_V3.1180, Oliveira, et al., submetido para publicação) com uma cauda de 6 histidinas (NH6) na extremidade amina (NT). Essa proteína possui 5,5 domínios com motivos repetitivos de 39 AA (5R) seguidos de um domínio não repetitivo de 76 AA (ver Figura 1). Dentre um grupo de proteínas recombinantes de *L. chagasi* selecionado a partir de uma mistura de soro de cães com a infecção natural, rLci2B-NH6 foi escolhida arbitrariamente para a avaliação do seu potencial no desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. Além disso, por razões mencionadas na secção de resultados (5.1) e que também serão mencionadas abaixo, foi gerada uma proteína recombinante iniciada com NH6, seguida de 701 AA da NT (Burns et al., 1993; Gerald, et al., 2007) e do segmento não repetitivo de 76 AA da CT da cinesina (rLci2-NT-CT-NH6, Gerald, et al., 2007; <http://www.genedb.org>: código de acesso do gene LinJ14_V3.1180; Oliveira, et al., submetido para publicação). Foi gerada ainda uma outra proteína (rLci2-NT-5R-CT-NH6) para uso como controle exibindo 5R entre os domínios não repetitivos de rLci2-NT-CT-NH6. As proteínas rLci2B-NH6, rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 foram produzidas em *E. coli* da cepa BL21(DE3)pLysS e, posteriormente, purificadas através de cromatografia de troca iônica. A análise dessas proteínas por SDS-PAGE e *Western blot*, realizada com anticorpo anti-histidina, mostrou que a maior parte da rLci2B-NH6 estava intacta e as proteínas rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 estavam degradadas (Figura 3), provavelmente, devido à proteólise. A proteólise pode ter ocorrido durante a produção dessas proteínas no citoplasma da *E. coli* ou durante o processamento do sedimento bacteriano para a purificação. Em um experimento realizado, no qual foram usados inibidores de proteases durante o processamento do sedimento bacteriano,

rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 apresentaram degradação, sugerindo que houve proteólise durante a produção dentro da *E. coli*.

Para a realização do experimento visando à avaliação de IL-12 e IL-2, a purificação do plasmídeo gerou produtos de boa qualidade para a administração em camundongos (Figura 4). Embora não tenha sido avaliada concentração de IL-12 e IL-2, ou mesmo a de IFN- γ , no soro, para se confirmar a expressão de cada plasmídeo, provavelmente, ocorreu produção dessas citocinas após a administração do plasmídeo. Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, foi observado um aumento do tamanho do baço e aumento da concentração de IFN- γ no soro de camundongos BALB/c injetados com 50 μ g de pcDNA3.1-scmu-12 AEL (PINHEIRO, 2007). Além disso, o sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-mu-IL-2 promoveu proliferação de células CTLL-2 (células dependentes de IL-2, (GILLIS *et al.*, 1998), gerando uma curva dose-resposta (MENDES, A.M. dados não publicados).

Como IL-12 e IL-2 exercem atividade sinérgica na produção de IFN- γ (KOBAYASHI *et al.*, 1989, GOLLOB, *et al* 2000) e, em tese, a combinação dessas duas citocinas poderia promover respostas predominantemente celulares a antígenos simultaneamente administrados de uma maneira mais eficiente que IL-12 isoladamente. Previamente, a tentativa de promover polarização para resposta imune Th1 em camundongos BALB/c imunizados com rLci2B-NH6/saponina pela administração de doses diferentes (variando 0,4 a 50 μ g) de pcDNA3.1-scmu-IL-12 resultou em insucesso (PINHEIRO, 2007). No presente estudo, foi realizada a avaliação de camundongos BALB/c imunizados com rLci2B-NH6/saponina em combinação com 50 μ g de pcDNA3.1-scmu-IL-12 AEL e 50 μ g pcDNA3.1-mu-IL-2 AEL, a qual, infelizmente também, resultou em insucesso no que tange a indução de resposta imune específica predominantemente celular.

Pode ser que a indução de resposta imune do tipo Th1 seja particularmente difícil para rLci2B-NH6. Outros autores ao imunizarem camundongos com uma proteína recombinante *L. donovani* (denominada rORFF), em associação a plasmídeo codificando IL-12, observaram uma resposta imune específica com produção de anticorpos IgG2a e IFN- γ , fato que ocorreu em menor ordem de magnitude quando os camundongos foram imunizados somente com rORFF (TEWARY, 2006)

Uma outra possibilidade para explicar a não indução de resposta predominantemente celular a rLci2B-NH6 seria o fato da combinação IL-12 e IL-2 ter induzido a produção de uma grande quantidade de IL-10, citocina capaz de promover supressão da produção de IFN- γ (JEANNIN *et al.*, 1996; BASHYAM *et al.*, 2007).

O insucesso na indução de resposta imune polarizada para tipo Th1 em camundongos imunizados com rLci2B-NH6/saponina em combinação pcDNA3.1-scmu-IL-12 AEL e/ou pcDNA3.1-mu-IL-2 AEL poderia estar relacionado à estrutura da rLci2B-NH6, que possui vários domínios repetitivos. A apresentação a células T auxiliaadoras de antígenos com domínios repetitivos é realizada por linfócitos B provavelmente e gera resposta imune predominantemente do tipo Th2 (GOTO *et al.*, 2006; LINDELL *et al.*, 2008). Uma estratégia para determinar se os domínios repetitivos de rLci2B-NH6 eram responsáveis pela indução de resposta imune do tipo Th2 e estariam dificultando a polarização da resposta imune para Th1, quando essa proteína recombinante é usada em associação com saponina e IL-12 e/ou IL-2, seria a produção de uma molécula recombinante composta exclusivamente dos segmentos não repetitivos do gene que codifica rLci2B-NH6 (BURNS *et al.*, 1993; GERALD, *et al.*, 2007; <http://www.genedb.org>: código de acesso do gene LinJ14_V3.1180). Por isso, foi elaborada uma construção plasmideal capaz de produzir a proteína rLci2-NT-CT-NH6 em *E. coli* descrita acima. Além disso, para uso como controle foi elaborada uma construção plasmideal capaz de produzir a proteína rLci2-NT-5R-CT-NH6. A imunização de camundongos BALB/c com rLci2-NT-CT-NH6/saponina resultou na produção de anticorpos específicos das subclasses IgG2a e IgG1, com uma proporção dos valores de densidade óptica obtidos por ELISA de 0,55, proliferação de esplenócitos na ausência da produção de IFN- γ e de IL-5, após a estimulação com rLci2-NT-CT-NH6 *in vitro*. Já a imunização com rLci2-NT-5R-CT-NH6 levou a uma produção de anticorpos específicos, aparentemente, da mesma ordem de magnitude observada para rLci2-NT-CT-NH6, proliferação de esplenócitos na ausência da produção de IFN- γ e produção de IL-5, após a estimulação com rLci2-NT-5R-CT-NH6 *in vitro*. Esses dados indicam uma pequena diferença entre resultados obtidos na imunização com rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 e, infelizmente, não mostram uma polarização de resposta imune no grupo injetado com rLci2-NT-CT-NH6. Como descrito acima, durante o processo de purificação das proteínas rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 provavelmente ocorreu proteólise, que poderia levar à destruição de epítomos

apropriados para a apresentação a células T CD4⁺ Th1 e a interpretação destes resultados ficou prejudicada. Portanto, em um futuro próximo serão realizados experimentos para se determinar condições para purificação de rLci2-NT-CT-NH6 e rLci2-NT-5R-CT-NH6 na forma intacta para uso em imunização.

Interessantemente, Dey e colaboradores, 2008, observaram que a imunização de camundongos BALB/c com um fragmento de 330 AA da NT de cinesina (rLvacc) de *Leishmania donovani* (Gerald et al., 2007; DEY A *et al* 2008) resulta na proliferação específica de esplenócitos e produção de IFN- γ , sugerindo o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1.

Em nosso laboratório, durante a realização de vários experimentos foi observada a morte de cerca de 5 % dos camundongos injetados com 100 μ g saponina (FRAGA, 2007; PINHEIRO, 2007 e dados não publicados). Aparentemente, a morte dos camundongos decorre do uso de saponina sem outro fator predisponente associado. Por vezes, a morte de até dois animais de um mesmo grupo de 6 camundongos foi observada, causando um problema para a comparação estatística de resultados entre os grupos. Visando a busca de doses menores (menos tóxicas) capazes de promover efeito adjuvante apropriado, no presente trabalho foi avaliada a imunização de camundongos BALB/c com rLci2B-NH6 em combinação com 100, 50 ou 25 μ g de saponina por dose. A mensuração de anticorpos anti-rLci2B-NH6 da classe IgG e subclasses IgG2a e IgG1 foi semelhante nos 3 grupos. O grupo injetado com 25 μ g foi o único que apresentou proliferação específica de esplenócitos em comparação ao grupo controle negativo (PBS). Interessantemente, grupo injetado com 50 μ g de saponina apesar de não exibir proliferação específica de esplenócitos produziu IFN- γ sem sintetizar em quantidades significativamente maiores de IL-5 que o grupo PBS. Ao passo que o grupo injetado com 100 μ g de saponina produziu maior quantidade de IFN- γ e IL-5, em comparação ao grupo PBS. No que tange a indução de resposta imune celular, talvez, a dose mais promissora seja a de 50 μ g. Durante a realização desse experimento foi observada a morte de um animal do grupo 25 μ g 3 dias após a terceira dose de saponina.

Saponinas, que são glicosídeos naturais de esteróides ou terpenos encontrados em muitas plantas, são capazes de exercer intensa atividade adjuvante quando administradas simultaneamente com antígenos (SUN *et al.*, 2009). A partir da extração da casca de uma planta sul-americana chamada *Quillaja saponaria* pode se obter uma mistura de saponinas

denominada Quil A. Quando o extrato Quil A é submetido a cromatografia de fase reversa usando o método de cromatografia de alta performance (HPLC), várias frações distintas são obtidas, incluindo QS-7, QS-17, QS-18, and QS-21, sendo que cada uma das frações pode apresentar diferentes capacidades imunoestimulatórias e toxicidade (KENSIL *et al.*, 1991). Toxicidade resultando em morte de camundongos também foi encontrada por Sun e colaboradores, que relataram a perda de 2 de 5 camundongos injetados com Quil A quando injetada 100 µg por dose (SUN *et al.*, 2010).

Interessantemente, na maioria das vezes Quil A e a maioria das suas frações tendem a promover resposta imune mista (Th1 e Th2) a antígenos co-administrados (TADOKORO *et al.*, 1996; MARCIANI *et al.*, 2003). Contudo, na dependência da fração de Quil A utilizada como adjuvante separadamente ou em associação com outra substância adjuvante, por exemplo, monofosforil A, a resposta imune resultante pode ser predominantemente do tipo Th1 (MOORE *et al.*, 1999; MARCIANI *et al.*, 2003). Por isso, seria interessante testar, no futuro, frações de Quil A associadas ou não a monofosforil A na tentativa de induzir resposta imune Th1 a antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* selecionados em nosso laboratório.

7 CONCLUSÕES

- A adição de pcDNA3.1-mu-IL-2 no protocolo de imunização com rLci2B-NH6/saponina/pcDNA3.1-scmu-IL-12 não promoveu desvio da resposta imune (Th1/Th2) para predominante do tipo Th1 em camundongos BALB/c;
- A imunização com rLci2B-NT-CT-NH6/saponina, dentro das condições testadas, não foi capaz de induzir resposta imune predominantemente do tipo Th1 em camundongos BALB/c;
- Dentre as doses de saponina avaliadas (100, 50 e 25 µg) para a indução de resposta imune a rLci2B-NH6, a dose de 50 µg foi a única que produziu IFN- γ na ausência de produção de IL-5, comparada com a administração de salina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S., M. COLMENARES, L. SOONG, K. GOLDSMITH-PESTANA, L. MUNSTERMANN, R. MOLINA AND DIANE MCMAHON-PRATT. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect Immun** 71(1): 401-10. 2003.

AIHARA, H.; MIYAZAKI, J.I. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. **Nature biotechnology**, volume 16. 1998.

ANDRE S, SEED B, EBERLE J, SCHRAUT W, BULTMANN A, HAAS J. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. **J Virol**; 72(2):1497-503. 1998.

GOLLOB, J. A., J. W. L, Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic área, **Vet Parasitol**. 2006.

BASHYAM H, Th1/Th2. cross-regulation and the discovery of IL-10. **J Exp Med** 204: 237, 2007.

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.

BIRON CA, NGUYEN KB, PIEN GC, COUSENS LP, SALAZAR-MATHER TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**.;17:189-220. 1999.

BORJA-CABRERA GP, CORREIA PONTES NN, DA SILVA VO, PARAGUAI DE SOUZA E, SANTOS WR, GOMES EM,. Long lasting protection against canine kalaazar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). **Vaccine**; 20:3277-84. 2002.

BOYER JD, ROBINSON TM, KUTZLER MA, PARKINSON R, CALAROTA SA, SIDHU MK. SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques. **J Med Primatol**; 34(5-6):262-70. 2005.

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 U S A** 90: 775-9. 1993.

CARVALHO EM, 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.

CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J.; HORIG, H. A.; WOLF, S. F.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **J. Exp. Med.**, 173(4):869-879. 1991.

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

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.

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

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

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

GATELY, M. K.. B. B. DESAI, A. G. WOLITZKY, P. M. QUINN, C. M. DWYER, F. J. PODLASKI, P. C. FAMILLETTI. F. SINIGAGLIA, R. CHIZZONITE, U. GUBLER, AND A. S. STEM. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine. IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). **j. immunol.** 147:874. 1991.

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 HW, PIUVEZAM MR, SKEIKY YA, SIDDIG M, HASHIM FA, EL-HASSAN AM, Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**; 92 : 324-9. 1993.

GILLIS S, FERM MM, OU W, SMITH KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. **J Immunol** 120: 2027-32. 1978.

GOLLOB, J. A., J. W. MIER., Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 1 2 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. **Clin Cancer Res** 6(5): 1678-92. 2000.

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.

GRANUCCI, F., I. ZANONI, ZANONI I, FEAU S AND RICCIARDI-CASTAGNOLET P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. **Embo J** 22(11): 2546-51. 2003.

MOSMANN, T. R. MOTYKA. N. NABAVI, A. G. WOLITZKY. P. M. QUINN, P. C. FAMILLETTI, AND M. K. GATELY. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted oactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:4143. 1991.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA / MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7: 145-173.

HSIEH, C. S., MACATONIA, S. E., TRIPP, C. S., WOLF, S. F., O'GARRA, A. MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, vol 260. 1993.

JEANNIN P, DELNESTE Y, SEVESO M, LIFE P, BONNEFOY JY., IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. **J Immunol** 156: 3159-65. 1996.

JERONIMO SM, OLIVEIRA RM, MACKAY S, COSTA RM, SWEET J, NASCIMENTO ET, LUZ KG, FERNANDES MZ, JERNIGAN J, PEARSON RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil, **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 88(4):386-8. 1994.

JOHN P. LEONARD, MATTHEW L. SHERMAN, GERALD L. FISHER, LYNN J. BUCHANAN, GLENN LARSEN, MICHAEL B. ATKINS, JEFFREY A. SOSMAN, JANICE P. DUTCHER, NICHOLAS J. VOGELZANG, AND JOHN L. RYAN. Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12 Associated Toxicity and Interferon-g Production. **Blood**, Vol 90, No 7, pp 2541-2548. 1997.

KAUFMAN, H. L.; FLANAGAN, K.; LEE, C. S.; PERRETTA, D. J.; HORIG, H. Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective antitumor responses without toxicity. **Vaccine**, 20(13-14):1862-1869. 2002.

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.

KOBAYASHI, M., L. FITZ, M. RYAN, R. 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., Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, 266(5603):628-630. 1977.

LEMESRE, J. L., P. HOLZMULLER. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine**. 25(21): 4223-34. 2007.

LINDELL DM, BERLIN AA, SCHALLER MA, LUKACS NW, B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PLoS ONE** 3: 3129. 2008.

MARCIANI DJ, REYNOLDS RC, PATHAK AK, FINLEY-WOODMAN K, MAY RD, Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. **Vaccine** 21: 3961-71. 2003.

RHALEM A. AND K. B. F. MARZOCHI Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brasil - Emerging Anthrozoosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública** 10: 359-375. 1994.

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

MC ADAM, A. J.; SHARPE, A. H. IN: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ROBBINS AND COTRAN. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: **Elsevier**, p.343-414. 2005.

MIRÓ, G., Canine leishmaniasis new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.** 24, 371–377. 2008.

MOORE A, MCCARTHY L, MILLS KH., The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1. **Vaccine** 17: 2517-27. 1999.

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

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.

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.; MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F., Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, 151(2):929-938. 1993.

NASTALA CL, EDINGTON HG, MCKINNEY TG, TAHARA H, NALESNIK MA, BRUNDA MJ, GATELY MK, WOLF SF, SCHREIBER RD, STORKUS WJ, LOTZE MT., Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-g production. **J Immunol** 153:1697. 1994.

NEOGY AB, NANDY A, GHOSH DASTIDAR B, CHOWDHURY AB, Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment. **Ann Trop Med Parasitol** 81: 727-9. 1987.

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.

ORTALDO, J. R.; WINKLER-PICKETT, R. T.; BERE, E. W., JR.; WATANABE, M.; PINELLI E, GONZALO RM, BOOG CJ, RUTTEN VP, GEBHARD D, DEL REAL G, RUITENBERG EJ,. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol** 25: 1594-600. 1995.

PINELLI, E., R. M. GONZALO, C. J. BOOG, V. P. RUTTEN, D. GEBHARD, *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol.** 25(6): 1594-1600. 1995.

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* (lc9) e saponina. Salvador. Dissertação (Mestrado em imunologia) - Universidade Federal da Bahia.

QUEIROZ, P.V.S., Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in veterinary science**, volume 86, pag 267-73. 2009.

REFAELI, Y.; VAN PARIJS, L.; LONDON, C. A.; TSCHOPP, J.; ABBAS, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 8(5):615-623. 1998.

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, GUESSOUS-IDRISSI N, LASRI S, NATAMI A, RIYAD M, BERRAG B, Immune response against Leishmania antigens in dogs naturally and experimentally infected with Leishmania infantum. **Vet Parasitol** 81: 173-84. 1999.

RIOUX, J. A., LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum Comp.**, 65: 111-125. 1990.

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.

SCHNEIDER R, CAMPBELL M, NASIOULAS G, FELBER BK, PAVLAKIS GN., Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows re-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. **J Virol**; 71(7): 4892-903. 1997.

WONG, H. L, MORELL P, ARBOIX M, ALBEROLA J, FERRER L, Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in vitro. **Cell. Immunol.** 111:39: 560-3. 2001.

YANG JS, KIM JJ, HWANG D, CHOO AY, DANG K. GATELY. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87. 1990.

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

SUN Y, LIU J, YU H, GONG C, Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of Pulsatilla chinensis with less adverse reactions. **Int Immunopharmacol** 10: 584-90. 2010.

SUNDAR S, SINGH RK, BIMAL SK, GIDWANI K, MISHRA A, Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Trop Med Int Health** 12: 284–289. 2007.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**; 6: 849-54. 2001.

TADOKORO CE, MACEDO MS, ABRAHAMSOHN IA, Saponin adjuvant primes for a dominant interleukin-10 production to ovalbumin and to *Trypanosoma cruzi* antigen. **Immunology** 89: 368-74. 1996.

TANIGUCHI, T.; MATSUI, H.; FUJITA, T.; TAKAOKA, C.; KASHIMA, N.; YOSHIMOTO,R.; HAMURO, J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, 302(5906):305-310. 1983.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G. S.; MARCO A. SILVANY. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals** 35: 51-54. 2007.

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

TOWBIN, H.,STAEHELIN, T.,GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol 76, 4350-4. 1979.

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

TRINCHIERI, G.,MATSUMOTO-KOBAYASHI, M., CLARK, S. C.,SEEHRA, J., LONDON, L. PERUSSIA, B., Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2, **J Exp Méd**, vol 160, 1147-69. 1984.

VAN PARIJS, L.; ABBAS, A. K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, 280(5361):243-248. 1998.

WALKER P S., SCHARTON-KERSTEN T, ARTHUR M. KRIEG, LAURIE LOVE-HOMAN,EDGAR D. ROWTON§, MARK C. UDEY, AND JONATHAN C. VOGEL. 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. 1999.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J., The biology of IL-12. 2003.

WOLF SF, TEMPLE PA, KOBAYASHI M, YOUNG D, DICIG M, LOWE L, DZIALO R, FITZ L, FERENZ C, HEWICK RM., Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J Immunol** 146: 3074-81. 1991.

WONG, H. L., D. E. WILSON, J. C. JENSON, P. C. FAMILLETTI, D. L. STREMLO, AND M. K. GATELY., Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allo- geneic human cytolytic T-lymphocyte responses in vitro. **Cell. Immunol.** 111:39. 1988.

YANG JS, KIM JJ, HWANG D, CHOO AY, DANG K, MAGUIRE H, ET AL., Induction of potent Th1-type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile virus New York isolate (WNV-NY1999). **J Infect Dis**;184(7):809-16. 2001.