

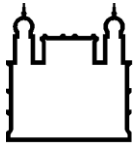
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA DE DUAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM
MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS
BALB/C E HAMSTER DOURADO**

PRISCILA DE ASSIS TOSTES

Rio de Janeiro
Maio de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PRISCILA DE ASSIS TOSTES

IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE
Leishmania (Viannia) braziliensis EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS BALB/C E HAMSTER DOURADO

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida
Prof. Dra. Patrícia Cuervo Escobar

Rio de Janeiro

Maio de 2015

Tostes, Priscila de Assis.

Imunogenicidade e eficácia de duas proteínas recombinantes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em modelo de infecção experimental em camundongos Balb/C e hamster dourado / Priscila de Assis Tostes. - Rio de Janeiro, 2015.

xv, 77f f.; il.

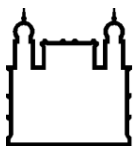
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Orientador: Renato Porrozi de Almeida.

Co-orientadora: Patrícia Cuervo Escobar.

Bibliografia: f. 59-77

1. Leishmaniose cutânea. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. proteína recombinante. 4. imunogenicidade. 5. infecção experimental. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PRISCILA DE ASSIS TOSTES

**IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE
Leishmania (Viannia) braziliensis EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS BALB/C E HAMSTER DOURADO**

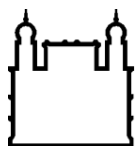
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida
Prof. Dra. Patrícia Cuervo Escobar**

Aprovada em: 21 / 05 / 2015

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz (IOC) – Revisora e Presidente da banca
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (UFRJ) – Membro da banca
Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto (IOC) – Membro da banca
Prof. Dr. Antônio Teva (ENSP) – 1° suplente
Prof. Dr. Paula Mello de Luca (IOC) – 2° suplente

Rio de Janeiro, 21 de Maio de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

A todos que me incentivam a permanecer nessa caminhada, pois sem esse apoio nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Renato Porrozzi de Almeida e Dra. Patrícia Cuervo Escobar pela oportunidade de trabalho, pela orientação, pelo apoio, pela confiança, pelos ensinamentos, conselhos e críticas, pela dedicação e fundamental colaboração na minha formação profissional.

À Dra. Elisa Cupolillo pela receptividade, incentivo e contribuição científica.

À Dra. Leila de Mendonça Lima e ao Dr. Marco Alberto Medeiros pela dedicação e atenção nos ensaios de clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes. Agradeço por todo auxílio aos integrantes do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática e aos integrantes do Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos, sempre solícitos.

Ao Dr. Antônio Gonçalves do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais pelo apoio, atenção e disponibilidade na obtenção dos anticorpos policlonais.

À Dra. Camila Souza Lemos pela colaboração intelectual e na execução dos experimentos. Agradeço também todo apoio, paciência, atenção e amizade dedicados.

À Cíntia pela ajuda, apoio, força, carinho e amizade que certamente levarei comigo para sempre.

À Monica, Andrés, Joana e Virgínia, pelo apoio, amizade e carinho. A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose pelas trocas de ideias e agradável convívio diário.

À minha grande amiga Caroline Batista por toda ajuda, pelas conversas incansáveis, carinho, risadas e consolo. Certamente sua amizade tornou a distância de casa menos dolorosa.

À Dra. Daniella Arêas, pela revisão deste trabalho e aos doutores que aceitaram compor a banca para avaliação desta dissertação.

Aos meus pais José Soares e Amelia, pela minha educação, apoio e por tudo que me proporcionaram. Ao meu irmão Eder, minha cunhada Micheli, minha tia Célia e meus primos Érique e Júlio César, por sempre incentivarem e acreditarem na minha capacidade. Um agradecimento especial à minha mãe, que nunca deixou de me incentivar a correr atrás dos meus objetivos, mesmo sabendo as dificuldades que seriam acarretadas. E pelo carinho, amor e paciência nos momentos de maior estresse.

Às minhas grandes amigas Gisele, Kryslaine, Livia, Paula e Tatiana, pela amizade, força e momentos de grande felicidade.

Aos amigos do Neovida, em especial Joyce, Marcus e Dra. Luzia, que sempre me incentivaram. Ao Dr. Ivo cujo suporte me permitiu chegar até aqui. Ao Dr. Luiz Alberto, meu maior incentivador, meu exemplo profissional e amigo querido, cujas conversas foram essenciais para concluir esta etapa e que me dão credibilidade de ir além.

Às amigas Jacqueline e Talita pela convivência e por tornarem a minha adaptação à nova cidade mais agradável.

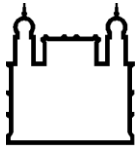
Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Plataforma IOC de Citometria de Fluxo.

À FIOCRUZ/IOC pela infraestrutura, à Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

“Uma vez tendo experimentado voar,
caminharás para sempre sobre a Terra de
olhos postos no céu, pois é para lá que
tencionas voltar.”

(Leonardo Da Vinci)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

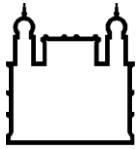
IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/C E HAMSTER DOURADO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila de Assis Tostes

Diferentes estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose cutânea (LC), utilizando diversos modelos experimentais que reproduzem a doença humana. Porém, ainda não existe uma vacina que promova uma proteção sólida contra essa doença. A vacinação é considerada uma forma de controle de doenças com efetiva redução da mortalidade e da morbidade. Para tal, a informação a respeito dos antígenos imunogênicos de *Leishmania* é importante devido à complexidade do parasita, além da identificação de novos antígenos permitir o melhor entendimento do processo patológico e a criação de estratégias vacinais. Dada a importância epidemiológica global da LC, a busca por novas ferramentas que visam auxiliar no controle e terapêutica da doença podem contribuir para a minimização do impacto dessa patologia. No cenário epidemiológico brasileiro e da América Latina, a espécie *L. (V.) braziliensis* possui uma posição de destaque devido sua ampla distribuição. Com base no mapa proteômico de cepas de *L. (V.) braziliensis* desenvolvido pelo nosso grupo, identificamos duas moléculas candidatas ao desenvolvimento de vacinas de segunda geração. Nesta dissertação foram expressas duas proteínas recombinantes (Lb1r e Lb2r) de *L. (V.) braziliensis* e avaliadas em separado e em conjunto, quanto ao seu potencial imunogênico e sua capacidade de induzir proteção contra o desafio com *L. (V.) braziliensis*, nos modelos experimentais de camundongos BALB/c e hamsters dourados. Os animais foram separados em grupos que receberam separadamente Lb1r + CpG ODN ou Lb2r + CpG ODN, ou ainda Lb1r + Lb2r + CpG ODN, em 3 doses. Os resultados demonstram a imunogenicidade dos antígenos recombinantes através da promoção da produção de altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos em camundongos BALB/c. As células do baço dos camundongos do grupo que recebeu as duas proteínas associadas ao adjuvante apresentaram um aumento na razão de IFN- γ / IL-10, em relação ao grupo que recebeu somente o adjuvante, após a imunização. Os grupos não apresentaram diferença estatística na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13, após a imunização ou após o desafio. A análise comparativa dos grupos antes e após o desafio revelou um aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ no grupo que recebeu somente o antígeno Lb1r associado ao adjuvante, pós-desafio. As diferentes formulações utilizadas na imunização não induziram proteção contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* nos modelos camundongo BALB/c e hamster dourado, uma vez que não foi observada diferença significativa no tamanho e na gravidade das lesões apresentadas, comparados aos grupos controles (PBS e CpG ODN). Entretanto, o grupo que recebeu as duas proteínas associadas ao CpG ODN apresentou lesões sempre menores e menos graves. Esse trabalho foi uma prova de conceito da aplicabilidade dos antígenos recombinantes de *L. (V.) braziliensis* Lb1r e Lb2r em estudos de vacinas. Os resultados obtidos contribuem com dois antígenos imunogênicos e capazes de modular a resposta imune. Porém, diferentes formulações e estratégias de administração precisam ser empregadas para que possamos atingir uma melhor eficácia com o uso destes antígenos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* EM MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS BALB/C E HAMSTER DOURADO

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Priscila de Assis Tostes

A variety of studies have been realized for developing a vaccine against cutaneous leishmaniasis (CL). Such studies have used different experimental models that reproduce the human disease. However, a vaccine that promotes a solid protection against this disease yet not exist. The vaccination is considered one way for controlling infectious diseases because of its effective reduction of mortality and morbidity. To accomplish that, the information about immunogenic antigens of *Leishmania* is important due the complexity of parasite. In addition, the identification of new antigens allows a better understanding of the pathological process and the creation of new vaccine strategies. Given the epidemiological importance of CL, the search for new tools that may help the disease control and therapeutics can contribute to minimize the impact of this pathology. In the Latin America, and particularly in the Brazilian epidemiological scenario, *L. (V.) braziliensis* species has a prominent position because of its wide distribution. Based on proteomic maps of *L. (V.) braziliensis* strains obtained by our group, we identified two molecules candidate for second-generation vaccine developing studies. In this dissertation two recombinant proteins were expressed from *L. (V.) braziliensis* (Lb1r and Lb2r) and then evaluated separately or together for their immunogenic potential and induction of protection against challenge with *L. (V.) braziliensis* in BALB/c mice and golden hamster experimental models. The animals were divided into groups that separately received three doses of Lb1r + CpG ODN or Lb2 + CpG ODN or Lb1r + Lb2r + CpG ODN. The results show the immunogenicity of the recombinant antigens through the promotion of high levels of IgG1 and IgG2a antibodies in BALB/c mice. The spleen cells of mice from the group which received the two proteins associated with adjuvant exhibited an increased ratio of IFN/IL-10 regarded the group which received only adjuvant, post immunization. The groups did not show statistical differences in frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN, TNF, IL-4, IL-10 and IL-13 post immunization or post challenge. The comparative analysis of the groups before and after the challenge reveals a significant increase in a CD4⁺ T cells frequency producing IFN in the group which received only the Lb1r antigen associated to adjuvant, post challenge. The different formulations used in the immunization did not induce protection against infection with *L. (V.) braziliensis* in the BALB/c mice nor golden hamster models, since it was not observed a significant difference in size or severity of lesions among the groups related to the control animals (PBS and CpG ODN). However, the group that received the two proteins associated to CpG ODN always showed smaller and less severe lesions. This work was a proof of concept about the applicability of recombinant antigens from *L. (V.) braziliensis* Lb1r and Lb2r in vaccine studies. The results contribute with two immunogenic antigens with capacity to modulate the immune response. Nevertheless, different formulations and delivery strategies need to be evaluated to achieve a better efficiency with the use of these antigens.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Leishmania</i> e as Leishmanioses	1
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	4
1.1.3 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	6
1.1.4 Resposta Imunológica à Leishmaniose	7
1.2 Vacinas contra Leishmaniose	11
1.1.5 Vacinas de segunda geração: antígenos recombinantes e adjuvantes	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Cultura de promastigotas	18
3.2 Obtenção dos antígenos recombinantes	18
3.3 Produção de anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r	22
3.4 Obtenção do antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	22
3.5 Western Blotting.....	23
3.6 Ensaio de avaliação do potencial vacinal dos antígenos recombinantes	24
3.7 ELISA.....	26
3.8 Avaliação da resposta imune celular.....	26
3.9 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Produção das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r de <i>L. (V.) braziliensis</i>	28
4.2 Obtenção de anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r	31

4.3	Imunização e avaliação da proteção contra a infecção com <i>L. (V.) braziliensis</i> em camundongos BALB/c e hamsters dourados.....	32
4.4	Avaliação da imunogenicidade das formulações vacinais utilizadas	35
4.5	Perfil fenotípico de linfócitos e frequência de células produtoras de citocinas em camundongos BALB/c imunizados.....	38
4.6	Avaliação da resposta imune humoral e celular após desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>	42
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ciclo biológico dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	2
Figura 1.2: Distribuição da concentração de casos de LTA no Brasil	4
Figura 1.3: Perfis de resposta imunológica na leishmaniose	10
Figura 3.1: Representação esquemática do vetor de expressão pET 28a.	19
Figura 3.2: Representação esquemática do vetor de expressão pET 100.	19
Figura 3.3: Desenho esquemático da linha do tempo do protocolo de desafio, acompanhamento das lesões e eutanásia dos animais desafiados.....	25
Figura 4.1: Análise da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r.....	28
Figura 4.2: Análise da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r	30
Figura 4.3: Titulação dos anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r.....	31
Figura 4.4: Decurso da infecção dérmica pela <i>L. (V.) braziliensis</i> em camundongos BALB/c, após a imunização	33
Figura 4.5: Gravidade das lesões dérmicas dos camundongos BALB/c desafiados com <i>L. (V.) braziliensis</i> , no decorrer da infecção	34
Figura 4.6: Avaliação do curso clínico e patológico das lesões de pele de hamsters dourados desafiados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
Figura 4.7: Resposta imune humoral elicitada nos grupos de camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio.	37
Figura 4.8: Subclasses de imunoglobulinas G geradas pela imunização de camundongos BALB/c com as diferentes formulações vacinais, antes do desafio.....	38
Figura 4.9: Perfil fenotípico da resposta imune celular de camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>	39
Figura 4.10: Produção de citocinas pelos linfócitos T CD4 ⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i> .	40
Figura 4.11: Produção de citocinas pelos linfócitos T CD8 ⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i> .	41
Figura 4.12: Razão entre a porcentagem de linfócitos T IFN- γ ⁺ e as citocinas IL-4 ⁺ , IL-10 ⁺ e IL-13 ⁺ , do baço dos camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>	42

Figura 4.13: Representação gráfica dos níveis das subclasses de IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais após desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	44
Figura 4.14: Resposta humoral gerada em camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais, após desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>	45
Figura 4.15: Perfil fenotípico da resposta imune celular de camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais, após o desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	46
Figura 4.16: Representação gráfica das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados e desafiados com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	47
Figura 4.17: Representação gráfica das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD8⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados e desafiados com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	48
Figura 4.18: Razão entre a porcentagem de linfócitos T IFN-γ⁺ e as citocinas IL-4⁺, IL-10⁺ e IL-13⁺, do baço dos camundongos BALB/c após o desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	49
Figura 4.19: Representação gráfica da frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN-γ do baço dos camundongos BALB/c antes e após o desafio com <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Reagentes para preparação do SDS-PAGE.....	21
Tabela 3.2: Protocolo de imunização dos animais para obtenção de soro policlonal anti-Lb1r e anti-Lb2r	22
Tabela 3.3: Protocolo de imunização dos animais conforme grupo pertencente	25
Tabela 4.1: Classificação por score das lesões dos camundongos.....	33
Tabela 4.2: Valores de p nos níveis de imunoglobulinas dos animais, conforme antígeno utilizado, em comparação aos animais do grupo G4.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina do soro bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IFN- γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
NK	Células “natural killer”
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e as Leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos das leishmanioses. O gênero foi proposto por Ross em 1903, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Essa família compreende protozoários parasitas de reprodução assexuada por divisão binária, com um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Além do material genético nuclear, estes parasitos possuem no seu citoplasma um DNA contido em uma organela mitocondrial, denominada cinetoplasto, que é uma característica comum entre os membros de sua ordem. O gênero *Leishmania* inclui um grande número de espécies descritas relacionadas a infecções em mamíferos (Cupolillo *et al.*, 2000; Schönian *et al.*, 2010). Nos hospedeiros invertebrados, os parasitas apresentam uma forma flagelada ou promastigota encontrada no interior do tubo digestivo. Nos hospedeiros vertebrados assumem a forma amastigota, ovalada com flagelo rudimentar e pouco móvel, que se multiplica no interior de macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (Lainson & Shaw, 1987; Desjeux, 2004; Kamhawi, 2006).

Os flebotomíneos ingerem as formas amastigotas presentes no sangue de indivíduo ou animal infectado. No intestino do inseto, as amastigotas se transformam em flagelados pequenos, ovóides, pouco móveis, não-infectivos, que se multiplicam intensamente (Bates, 2007; Kamhawi, 2006). Dentro de aproximadamente três a quatro dias de multiplicação, algumas promastigotas se diferenciam adquirindo um formato delgado, com flagelo longo, característico da forma metacíclica infectiva (Ashford, 2000; Ronet *et al.*, 2011). Ao alimentar-se no hospedeiro vertebrado, o flebotomo deposita um pequeno número de parasitas metacíclicos na pele, onde são opsonizadas por componentes do soro e fagocitadas por macrófagos (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Dentro dessas células, o fagossomo se funde ao lisossomo e esses promastigotas se transformam em amastigotas, capazes de resistir e se multiplicar no ambiente hostil em que se encontram (Sacks & Perkins, 1984;

Handman & Bullen, 2002; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Ronet *et al.*, 2011) (figura 1.1).

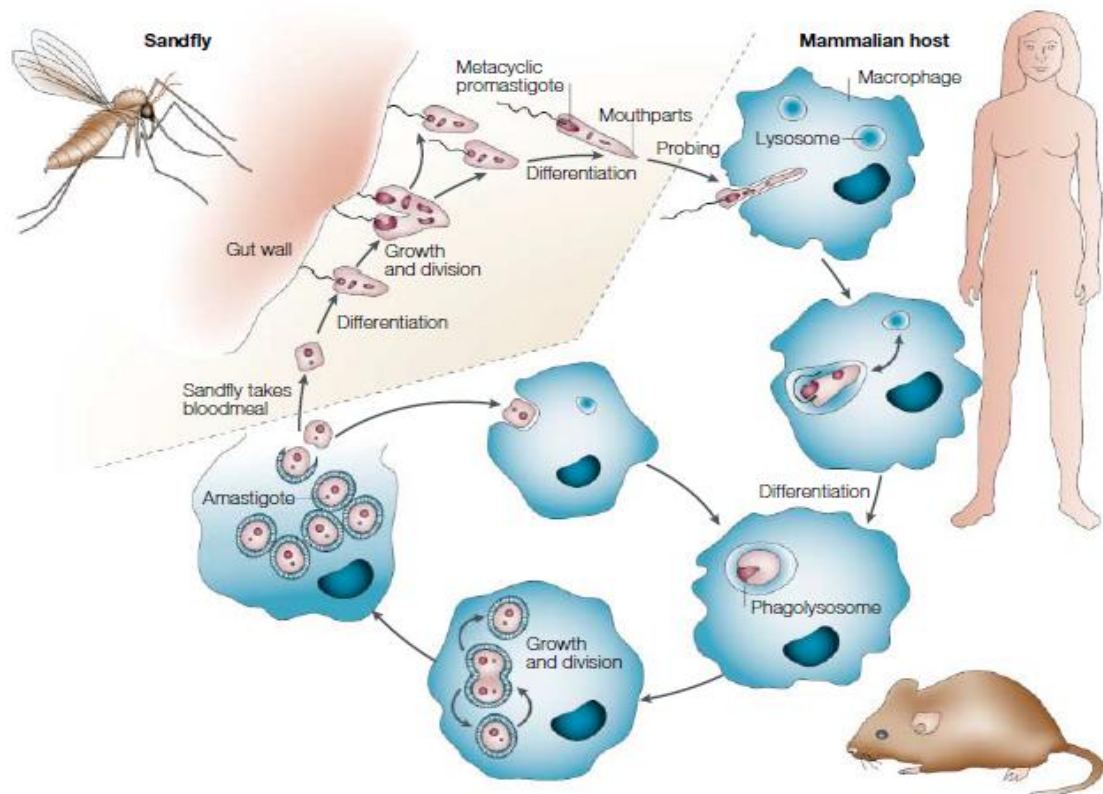


Figura 1.1: Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*. Os parasitas de *Leishmania* são transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicas dentro da pele. Essas formas são opsonizadas por componentes do soro e fagocitadas por macrófagos, onde residem no fagolisossomo e se diferenciam em amastigotas replicativas. Os macrófagos infectados são ingeridos por flebotomíneos durante a hematofagia; eles são lisados no intestino do flebotomíneo e os parasitas liberados se transformam rapidamente em promastigotas de estágio prolífico não-infectivos. Essas formas passam por um processo de fixação à parede do intestino, liberação e migração anterior, que é acompanhada pela diferenciação em promastigotas metacíclicas e que podem ser transmitidos quando o flebotomíneo se alimentar novamente (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

As leishmanioses são um grupo de doenças com manifestações clínicas de amplo espectro que podem se apresentar como infecção assintomática ou com lesões cutâneas únicas ou múltiplas (leishmaniose cutânea), lesões na mucosa orofaríngea (leishmaniose mucocutânea), ou como uma infecção visceral (leishmaniose visceral, também conhecida como Kala-azar) (Grimaldi & Tesh, 1993; Desjeux, 1996; Herwaldt, 1999; Desjeux, 2004; Reithinger *et al.*, 2007; David & Craft, 2009; WHO, 2013). Além de fatores do hospedeiro, a espécie do protozoário

envolvido na infecção influencia no polimorfismo da apresentação clínica da doença. Além disso, as variações na virulência encontradas entre parasitos da mesma espécie também pode influenciar no desfecho da infecção (Lainson & Shaw, 1987; Schönian *et al.*, 2010). Os ciclos de transmissão do parasito podem ser classificados em duas grandes categorias, conforme a origem da infecção humana: (i) zoonótica, com animais selvagens (roedores, edentados, marsupiais) e domésticos (principalmente os cães) como hospedeiros acidentais/reservatórios; e (ii) antroponótica, com os humanos cumprindo tal papel (Grimaldi & Tesh, 1993; Desjeux, 1996, WHO, 2010).

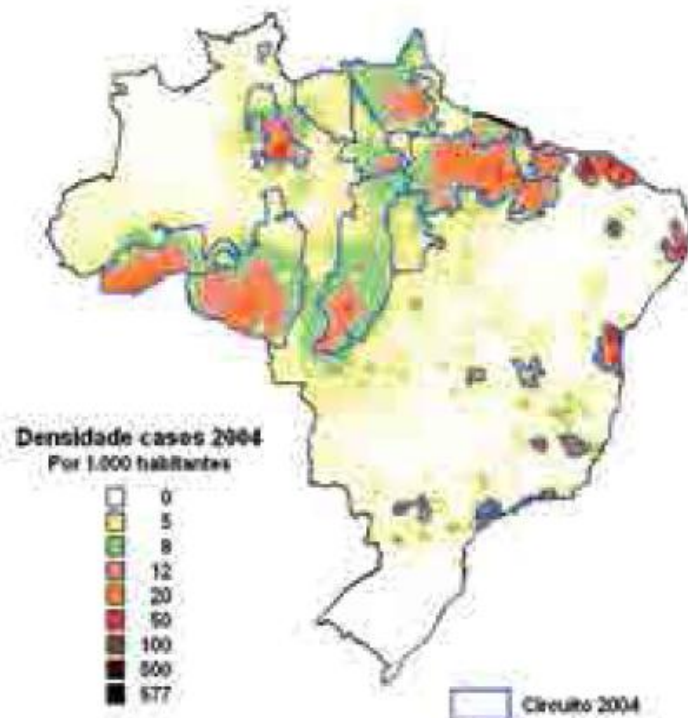
1.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta principalmente os países em desenvolvimento, onde se considera que 350 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença e cerca de 1.3 milhão de novos casos ocorram a cada ano (Ejov & Dagne, 2014). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil. Já a leishmaniose cutânea é amplamente distribuída, com dez países exibindo a maior estimativa de casos: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, que juntos somam 70 a 75% da estimativa de incidência global (Alvar *et al.*, 2012). Em áreas endêmicas, as condições precárias de moradia e saneamento ambiental, a falta de medidas de proteção pessoal e a migração de indivíduos que não possuem imunidade natural contra a doença, por razões econômicas, aumentam o risco de infecção. A falta de acesso a serviços de saúde provoca atrasos no diagnóstico e tratamento adequados e acentua a morbidade e mortalidade da doença (Alvar *et al.*, 2006).

No Novo Mundo, a variedade de espécies de *Leishmania* e suas diversas manifestações clínicas, bem como a diferença de padrão epidemiológico exibido por cada espécie, são complicadores para o controle da doença (Grimaldi & Tesh, 1993). As espécies pertencentes ao gênero podem ser divididas em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*). As espécies do subgênero *Leishmania* apresentam desenvolvimento limitado às regiões média e anterior do intestino do flebotômíneo. Enquanto as espécies do subgênero *Viannia* são encontradas na região posterior do intestino do vetor (Lainson & Shaw 1987; Kamhawi, 2006).

1.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada por uma diversidade de espécies de *Leishmania*, reservatórios e vetores. A LTA compreende as formas clínicas cutânea e mucocutânea, sendo que a forma cutânea pode se apresentar de maneira localizada, disseminada ou difusa (Goto & Lindoso, 2012). No Brasil já foram identificadas sete espécies relacionadas à infecção em humanos, das quais seis pertencem ao subgênero *L. (Viannia)* e uma ao subgênero *L. (Leishmania)*. As espécies mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* (Ministério da Saúde, 2013). A doença apresenta ampla dispersão no território brasileiro, com intensa concentração de casos nas regiões norte, nordeste e centro-oeste e casos isolados na região sul do país (figura 1.2). Acomete pessoas de ambos os sexos e todas as faixas etárias, com predominância de casos em indivíduos maiores de 10 anos, representando aproximadamente 90% e do sexo masculino, que corresponde a 74% (Ministério da Saúde, 2013).



Fonte: SVS e Fiocruz/MS

Figura 1.2: Distribuição da concentração de casos de LTA no Brasil. Ilustração da concentração de casos de LTA nos estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2013).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum e menos agressiva da doença. As lesões aparecem em áreas expostas do corpo, no local da picada do flebotomíneo e em geral são únicas. Estas lesões surgem como uma mácula e evoluem para uma pápula que ulcera e se expande a lesões com forma arredondada, de borda bem delimitada e indolores. Geralmente ocorre a cura sem tratamento, com ampla variação de tempo devido à identidade do parasita e à localização da lesão (Ashford, 2000; Goto & Lindoso, 2010; WHO, 2010; McGwire & Satoskar, 2014). Na leishmaniose cutânea disseminada (LCD) ocorre a aparência de múltiplas lesões pleiomórficas em áreas não contíguas do corpo. Já a forma difusa da doença é uma manifestação clínica rara, caracterizada por uma resposta imunológica anérgica do hospedeiro frente à infecção e com alta carga parasitária. A espécie *L. (L.) amazonensis* é a principal envolvida nos casos de leishmaniose difusa (LD) do Brasil (França-Costa *et al.*, 2012; Soong, 2012). A leishmaniose mucocutânea (LMC) apresenta uma destruição lenta, porém progressiva, dos tecidos mucosos e submucosos, na região das vias aéreas superiores (Machado-Coelho *et al.*, 2005). A mucosa nasal é a principal área afetada, mas também pode se desenvolver na faringe, laringe e cavidade oral. A LMC está associada com alta morbidade e pode levar a deformidades e mutilações que além de comprometer a ingestão de alimentos, impedem a respiração e a fonação (Marsden, 1990; WHO, 2010; Goto & Lindoso, 2012). Pode aparecer concomitantemente ou anos após uma lesão cutânea inicial, ou mesmo em pacientes sem qualquer história de leishmaniose cutânea (Ronet *et al.*, 2011). No Novo Mundo, a LMC é provocada principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (Herwaldt, 1999; WHO, 2010).

A ocorrência da infecção na mucosa orofaríngea, bem como a de lesões cutâneas recorrentes é atribuída à disseminação linfática ou hematogênica do parasito (Almeida *et al.*, 1996; Goto & Lindoso, 2012), conforme isolamento e detecção de DNA do parasito nos linfonodos (Sousa *et al.*, 1995) e em amostras de sangue de pacientes (Camera *et al.*, 2006). A imunopatogênese da LTA é fortemente influenciada pelo perfil imunológico do hospedeiro vertebrado e pela especificidade do antígeno da *Leishmania* spp. infectante (Carvalho *et al.*, 2012). A resolução da doença é raramente associada com a cura estéril (Mendonça *et al.*, 2004). Segundo Schubach e colaboradores (1998), o parasita persiste na pele por muitos anos apesar do tratamento. Dependendo de características específicas do

parasita e *status* imune do hospedeiro, esse fenômeno pode resultar em lesões de mucosa, ou por outro lado, no desenvolvimento da memória imunológica e resistência em indivíduos vivendo em áreas nas quais a leishmaniose é endêmica.

1.1.3 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A espécie *L. (V.) braziliensis* tem ampla distribuição desde a América Central até o norte da Argentina e além de todo o território brasileiro. Esta espécie é o principal agente etiológico da doença na América do Sul e provoca uma infecção que é caracterizada pela cronicidade, latência, e tendências metastáticas, cuja manifestação clínica pode variar de localizada a disseminada ou mucocutânea (Camera *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2013). Na maioria dos casos de LMC, os pacientes têm cicatrizes características de infecção cutânea prévia (Marsden, 1990).

É mais comum a ocorrência de LMC em homens do que em mulheres e estes tendem a desenvolver formas mais severas da doença, com uma alta incidência de perfuração e envolvimento de estruturas externas à cavidade nasal (Guerra *et al.*, 2011). O tratamento é mais difícil do que a forma cutânea, principalmente em pacientes em estágios mais severos e requer a administração prolongada dos fármacos, a qual está relacionada com efeitos adversos (Franke *et al.*, 1990; Herwaldt, 1999; Lawn *et al.*, 2004). As terapias utilizadas para o tratamento envolvem o uso de antimoniais pentavalentes tóxicos e a cura é dificilmente alcançada. Porém, quando não tratada, a necrose do tecido mucoso é progressiva e potencialmente fatal (Camera *et al.*, 2006).

Existe uma associação significativa entre a espécie de *Leishmania* infectante e o resultado do tratamento (Arevalo *et al.*, 2007; Goto & Lindoso, 2010). Entretanto, a resposta imunológica do paciente também poderia influenciar a manifestação clínica e o prognóstico da doença (Oliveira *et al.*, 2013). Dificuldades como o alto custo do tratamento, a resistência ao medicamento e os efeitos adversos tóxicos provocados pelos fármacos utilizados atualmente, impulsionam a busca por alternativas terapêuticas (Palacios *et al.* 2001, Singh & Sundar 2012, Badiie *et al.* 2007, Mutiso *et al.* 2013). Os antimoniais pentavalentes e seus derivados têm sido o tratamento recomendado há mais de 70 anos e a resistência a esses fármacos limitou o seu uso em algumas áreas endêmicas (Kedzierski *et al.*, 2009). A resposta ao tratamento varia dependendo das diferentes regiões geográficas, sugerindo a

existência de polimorfismo de parasitos com distintos graus de sensibilidade ao medicamento (Arevalo *et al.*, 2007). Geneticamente, isolados de populações naturais de *L. (V.) braziliensis* são altamente polimórficos (Cupolillo *et al.* 1998) e os parasitas dessa espécie e seus vetores apresentam habilidade de adaptação às mudanças em seu habitat original, inserindo o cenário urbano no ciclo de transmissão com importante impacto na saúde pública (Cupolillo *et al.*, 2003).

A LMC geralmente está associada com altos títulos de anticorpos circulantes e intensa resposta inflamatória, que, contudo, é incapaz de eliminar a infecção (Antonelli *et al.*, 2004; Amato *et al.*, 2008). A doença é caracterizada por um padrão de resposta imune mista tanto Th1 quanto Th2, com excesso células T e B (Amato *et al.*, 2008; Soong, 2012).

1.1.4 Resposta Imunológica à Leishmaniose

A imunidade inata possui um papel muito importante no controle do parasita, uma vez que macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células NK são a primeira linha de defesa, responsáveis por detectar o parasita e recrutar células pró-inflamatórias ao sítio de entrada dos protozoários para ajudar a conter e controlar a infecção (Carvalho *et al.*, 2012; Maurer *et al.*, 2009). Os parasitas podem se ligar a receptores do tipo *Toll* induzindo diretamente uma resposta inflamatória, ou pode ocorrer a interação entre macrófagos e parasitas através das moléculas de LPG e gp63 presentes na superfície do parasita, que se ligam ao receptor do complemento CR3 nos macrófagos, e essa ligação facilita a fagocitose desses protozoários pela sua principal célula hospedeira. Dentro do macrófago, os parasitas se transformam em amastigotas, se replicam ativamente até lisarem a célula e serem liberados para o meio extracelular para infectar novas células (Isnard *et al.*, 2012; Maurer *et al.*, 2009). A produção de mediadores com atividade anti-leishmanicida pela resposta imune inata contribui para o controle do parasita e propicia o desenvolvimento de uma resposta adaptativa eficiente (Faria *et al.*, 2012).

Os neutrófilos possuem grande importância na resposta imune inata devido principalmente ao fato de serem as primeiras células que migram para o sítio de infecção ou inflamação (Abi Abdallah & Denkers, 2012). São células de vida curta, com morte programada, cujos corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos como parte da resposta de cura e provocando um efeito anti-inflamatório (John & Hunter, 2008). Além disso, os neutrófilos também possuem a capacidade de liberar

estruturas filamentosas contendo DNA, histonas e grânulos de proteínas, conhecidas como *NETs* (*neutrophil extracellular traps*) que são capazes de capturar e matar micro-organismos (Gabriel *et al.*, 2010; Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Alguns trabalhos de infecção com *Leishmania* foram realizados demonstrando que as *NETs* são utilizadas no controle inicial da infecção por esse protozoário. De Moura e colaboradores (2005) demonstraram que no modelo da doença cutânea auto-resolutiva com *L. (V.) braziliensis*, em camundongos BALB/c, ocorre um recrutamento constante de neutrófilos no sítio de infecção, indicando a habilidade da resposta inata em assistir na cura da úlcera. Da mesma maneira, aspirados de linfonodos de pacientes com LC que apresentavam linfadenopatia, exibiram uma proporção aumentada de neutrófilos na fase inicial da doença, quando ainda não apresentavam ulceração, em comparação com pacientes em fase tardia (Bomfim *et al.*, 2007). Embora as *NETs* tenham se mostrado eficientes em provocar a morte de parasitos de *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009) e não a terem provocado em protozoários de *L. donovani* (Gabriel *et al.*, 2010), tal mecanismo é importante por contribuir com a contenção dos parasitos no sítio da infecção, facilitando a sua fagocitose por macrófagos (Gabriel *et al.*, 2010). Contudo, também foi observado que mecanismos associados com TNF- α e produção de superóxido provocam a eliminação dos parasitos durante a interação de macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* e neutrófilos vivos, sugerindo um papel para essas células na modulação da função dos macrófagos (Novais *et al.*, 2009). Todavia, quando fagocitada pelo neutrófilo, a *Leishmania* tem a habilidade de retardar a apoptose dessa célula. Os macrófagos são quimioatraídos para o sítio de infecção para a fagocitose dos neutrófilos infectados apoptóticos. Dessa maneira os parasitos são internalizados pelas suas células hospedeiras sem promover uma resposta hostil à sua infecção, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar. Além do mais, a ingestão dos neutrófilos infectados apoptóticos resulta na liberação de citocinas anti-inflamatórias que beneficia a sobrevivência do parasito (van Zandbergen *et al.*, 2004; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012). Por conseguinte, os neutrófilos são importantes no estabelecimento e promoção da doença, visto que a depleção dessas células em camundongos C57BL/6 resultou na redução da habilidade de parasitos de *L. major* em estabelecer a infecção (Peters *et al.*, 2008; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

O estabelecimento da resposta adaptativa ocorre através das células dendríticas por se tratarem das únicas células apresentadoras de antígenos com

habilidade em primar linfócitos T naïve (Moreno, 2007). Elas migram para os linfonodos e através da apresentação dos antígenos de *Leishmania*, em conjunto com a interação de moléculas co-estimulatórias e seus respectivos ligantes e as citocinas secretadas, podem primar os linfócitos T e promover a diferenciação das células T CD4⁺ naïve em células do tipo Th1 ou Th2 (Carvalho *et al.*, 2012; Ezra *et al.*, 2010).

O uso de modelo experimental murino infectado com *L. major* permitiu a identificação de uma resposta imunológica do hospedeiro dependente de células T CD4⁺ do tipo Th1, com produção de citocinas relacionadas e consequente ativação de macrófagos, pela via clássica, para o controle da doença (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Soong *et al.*, 2012). Em contrapartida, a diferenciação de células T CD4⁺ em Th2 está associada a lesões que não curam e à falha no controle da carga parasitária (Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). A resposta adaptativa do tipo Th1 no modelo resistente à infecção por *L. major* é caracterizada principalmente pela secreção de IFN- γ e TNF- α , enquanto no modelo susceptível a resposta Th2 dominante por IL-4, IL-5 e IL-13 (Mougneau *et al.*, 2011; Roberts, 2006; Rocha *et al.*, 2007) (figura 1.3). O IFN- γ ativa os macrófagos, promovendo a indução da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) com consequente produção de óxido nítrico, um potente agente microbicida envolvido na eliminação dos parasitos fagocitados (Bogdan *et al.*, 2000; Iniesta *et al.*, 2001). Já IL-4 e IL-13 ativam macrófagos pela via alternativa, na qual a L-arginina é utilizada como substrato para arginase 1, promovendo a síntese de putrescinas que favorecem a replicação do parasito (Ezra *et al.*, 2010; Liew, 2002; Sacks & Noben-Trauth, 2002). Além disso, já que a arginase 1 compete com a iNOS pelo mesmo substrato (Van Assche *et al.*, 2011), a via de eliminação dos parasitos não é ativada.

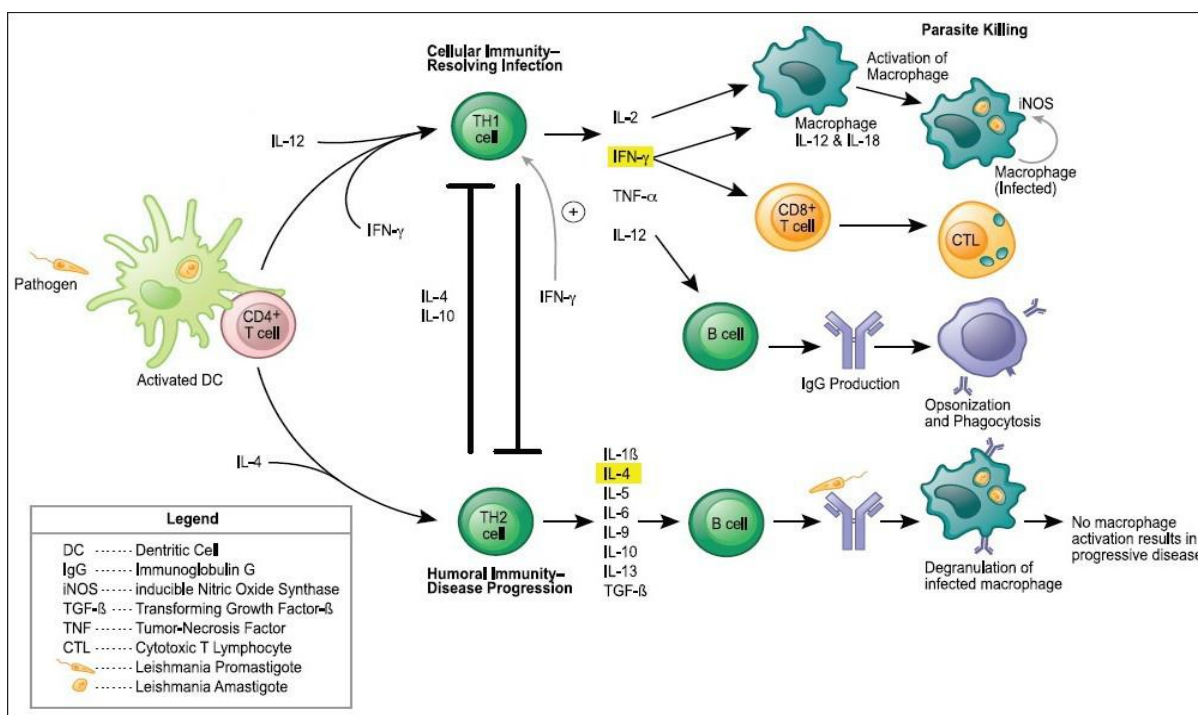


Figura 1.3: Perfis de resposta imunológica na leishmaniose. A resposta adaptativa do tipo Th1 é caracterizada pela secreção de IL-2, IFN-γ, TNF-α e IL-12 com ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico e células T citotóxicas, que eliminam os parasitos. Enquanto na resposta adaptativa do tipo Th2 a secreção de IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e TGF-β é característica com ativação de células B e produção de anticorpos que promovem a degranulação dos macrófagos infectados (adaptado de Ezra *et al.*, 2010).

As células T CD8⁺ recrutadas após a infecção por *Leishmania* podem reconhecer as células infectadas e atuar tanto por meio da citólise quanto secretando citocinas, como IFN-γ (Bomfim *et al.*, 2007; Jordan & Hunter, 2010; Mougneau *et al.*, 2011). Contudo, o aumento da frequência dessas células pode influenciar diretamente na destruição do tecido e conseqüente progressão da doença (Bomfim *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2009).

Um aumento na frequência de células B e plasmócitos foi observado em pacientes na fase tardia da leishmaniose (Bomfim *et al.*, 2007), porém complexos imunes formados por IgG além de falharem na proteção contra o patógeno podem contribuir para a progressão da doença através do estímulo de macrófagos a produzirem IL-10 (Miles *et al.*, 2005), que regula a resposta imune principalmente por inibir a síntese de IFN-γ e a ativação de macrófagos (Castellano *et al.*, 2009).

A diversidade de formas clínicas da doença é decorrente de fatores da espécie do parasita infectante, da genética do indivíduo infectado e da resposta imunológica gerada. O balanço entre a multiplicação dos parasitas e a resposta

imune influenciada pelo *background* genético pode resultar em um espectro de desfechos clínicos que vão desde a autorresolução da doença até alterações patológicas degenerativas. Alguns indivíduos são naturalmente resistentes à infecção, enquanto outros apresentam diferentes graus de susceptibilidade (Faria *et al.*, 2012; Maurer *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2008). Existe ainda uma grande porcentagem de indivíduos infectados com *Leishmania* e que não desenvolvem a doença, apresentam uma fraca resposta imune do tipo Th1, sugerindo que o controle parasitário nesses indivíduos seja dependente predominantemente da imunidade inata, como as células NK, que são uma importante fonte de IFN- γ (Bogdan, 2012; Carvalho *et al.*, 2012; Prajeeth *et al.*, 2011). Tudo isso reforça a complexidade da relação entre parasito e hospedeiro humano.

1.2 Vacinas contra Leishmaniose

O controle da transmissão da leishmaniose é dificultado pela diversidade biológica das espécies de *Leishmania*, seu polimorfismo genético e pelo grande número de vetores e potenciais animais reservatórios (Grimaldi & Tesh, 1993, Duthie *et al.*, 2012). Além do mais, o controle desses vetores é improvável em certos locais, como florestas e áreas abertas e onde é possível, o custo da infraestrutura e manutenção é alto (Coler *et al.*, 2002). A importância do papel da vacinação na contenção de doenças infecciosas, na história da humanidade, tem motivado o desenvolvimento desta estratégia como uma excelente alternativa para o controle de todas as formas da leishmaniose. O desenvolvimento de uma vacina segura, efetiva e disponível é uma prioridade crítica da saúde pública global, haja vista o impacto dessa infecção, principalmente nas populações mais pobres (Kedzierski, 2011; Badiee *et al.*, 2013). Uma vacina ideal para leishmaniose deveria ter o potencial singular de proteger contra mais de uma espécie e ser eficaz tanto no tratamento quanto na prevenção da doença (Coler & Reed, 2005).

A existência de leishmaniose auto-resolutiva e que geralmente confere proteção contra reinfecção, através do envolvimento da imunidade mediada por células, sugere a possibilidade do controle da doença por imunização (Grimaldi & Tesh, 1993). No Oriente Médio, utilizava-se a prática da infecção controlada com parasitas viáveis para proteger contra infecções subsequentes, conhecida como leishmanização, porém, foi descontinuada devido aos efeitos adversos e complicações clínicas (Coler *et al.*, 2002; Aebisher *et al.*, 2000).

O sequenciamento do genoma completo de *Leishmania* possibilitou a determinação de diversos alvos moleculares com potencial vacinal. Entretanto, apesar de existir uma variedade de antígenos identificados, o seu progresso na pesquisa é limitado devido a questões relacionadas com custo, complexidade antigênica, a variabilidade dos micro-organismos e as respostas mistas produzidas pelo hospedeiro (Singh & Sundar, 2012). Entretanto, diversos antígenos são altamente conservados entre as espécies e invariáveis durante o ciclo de vida do parasita, sendo assim, potencialmente utilizáveis no desenvolvimento de uma fórmula vacinal (Reed *et al.*, 2003).

A maior parte das vacinas licenciadas para uso em humanos induz proteção através de anticorpos específicos neutralizantes, que mantêm a resposta imunológica por um longo período de tempo. Patógenos intracelulares como *Leishmania*, requerem uma resposta imune celular para a proteção contra a infecção (Gurunathan *et al.*, 1998). As células T CD4⁺ são cruciais para a resistência, enquanto as células T CD8⁺ parecem estar mais relacionadas aos eventos de memória do que como células efetoras envolvidas na eliminação do parasita (Reed *et al.*, 2003). O desenvolvimento de uma vacina efetiva contra esses patógenos é comprometido pela falta de informações sobre os fatores requeridos para a manutenção da resposta imune e proteção contra a doença, bem como antígenos parasitários com essa capacidade, uma vez que uma resposta excessiva pode contribuir para a patogênese da doença (Gurunathan *et al.*, 1998).

No geral, são utilizadas três abordagens no desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose: (i) vacinas de primeira geração, que consistem na inoculação de parasitas mortos ou atenuados; (ii) vacinas de segunda geração, que são baseadas em subunidades sintéticas ou antígenos recombinantes; (iii) vacinas de terceira geração, que utilizam sequências de DNA codificadoras de antígenos (Handman, 2001; Okwor & Uzonna, 2009; Nagill & Kaur, 2011; Mutiso *et al.*, 2013). A seleção de antígenos alvo para uma vacina é baseada em características como especificidade ao protozoário ou ao estágio do ciclo de vida ou ainda, se é compartilhado por promastigotas e amastigotas e a conservação dentre as espécies (Handman, 2001).

Atualmente, diversos estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas para leishmaniose, tanto para proteção quanto para terapêutica da doença. Esses estudos utilizam proteínas nativas ou recombinantes dos parasitas,

vacinas de DNA, proteínas recombinantes ou vacinas de DNA expressos em vetores virais ou bacterianos, associados ou não com adjuvantes (Kedzierski, 2011; Singh & Sundar, 2012; Badiie, *et al.*, 2013; Kumar & Engwerda, 2014) e também avaliam o potencial de proteção cruzada contra espécies heterólogas (Iborra *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2014). A utilização de diferentes abordagens de vacinação para primar e reforçar a resposta imune (*prime-boost*), com diferentes formas de adjuvação ou de apresentação dos antígenos, tem se mostrado eficiente em promover proteção (Ferreira *et al.*, 2008; Jayakumar *et al.*, 2011; Mazumder *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2012) em camundongos BALB/c. Embora algumas formulações vacinais tenham sido eficientes na promoção de proteção contra a LC provocada por *L. (V.) braziliensis* em modelos animais experimentais (Ramirez *et al.*, 2013; da Silva-Couto *et al.*, 2015), somente uma vacina se encontra em fase de testes clínicos atualmente, a Leish-111f, a qual se trata de uma vacina poliproteica associada a um adjuvante Th1 e constituída por dois antígenos de *L. major* e um de *L. (V.) braziliensis*. Esses antígenos, quando associados a adjuvantes, se mostraram eficazes na proteção contra a infecção por *L. major* em modelos experimentais murino e primata (Campos-Neto *et al.*, 2001; Coler *et al.*, 2002; Coler & Reed, 2005).

1.2.1 Vacinas de segunda geração: antígenos recombinantes e adjuvantes

A vantagem das vacinas de subunidades é a possibilidade de utilizar somente parte do micro-organismo infeccioso, como peptídeos, proteínas ou polissacarídeos, para promover uma resposta imune, excluindo o risco de patogenicidade por não se replicarem no hospedeiro (Hansson *et al.*, 2000). Vacinas de proteínas recombinantes permitem prevenir diversos problemas inerentes de vacinas baseadas em macromoléculas, como por exemplo, a reversão de toxoides às suas formas tóxicas (Nascimento & Leite, 2012). Por possuir uma composição claramente definida, esse tipo de vacina é vantajosa em relação a considerações de segurança e minimização de efeitos adversos. Entretanto, geralmente estas vacinas são pouco imunogênicas e possuem um curto tempo de meia-vida *in vivo* (Hansson *et al.*, 2000).

A produção de proteínas recombinantes tem sido realizada a partir da utilização de diferentes sistema heterólogos, que podem ser simples bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, até eucariotos mais avançados como

Saccharomyces cerevisiae e células complexas de insetos e animais (Waegeman & Soetaert, 2011). O principal sistema utilizado para a expressão de proteínas recombinantes é a bactéria *E. coli* devido a sua genética bem caracterizada, capacidade de crescimento rápido em substratos baratos e disponibilidade de muitas ferramentas moleculares, apesar das desvantagens como a ausência de mecanismos para processar modificações pós-traducionais em proteínas de eucariotos (Waegeman & Soetaert, 2011). Diversos ensaios de vacina para leishmaniose têm sido realizados com proteínas recombinantes expressas por *E. coli* (Coler *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2008; Mazumder *et al.*, 2011; Jayakumar *et al.*, 2011; Daifalla *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2013), com alguns resultados muito promissores.

Para que uma resposta imune robusta seja promovida, as vacinas de segunda geração requerem, frequentemente, tanto doses múltiplas quanto o uso de adjuvantes (Hansson *et al.*, 2000). Os adjuvantes são um grupo heterogêneo de componentes capazes de reforçar a potência ou qualidade de respostas imunes específicas a antígenos ou de prolongá-las, mas com mínima toxicidade (Okwor & Uzonna, 2009; Alving *et al.*, 2012). Os adjuvantes podem promover respostas de anticorpos, atuar como agonistas da imunidade inata e como carreadores que apresentam o antígeno-alvo à célula efetora (Carter & Reed, 2010; Raman *et al.*, 2012), além de poderem influenciar a resposta imune de memória (Okwor & Uzonna, 2009). Para formulações que requerem uma potente resposta de células T, os adjuvantes que estimulam a resposta imune inata podem ser uma boa opção de escolha (Flynn *et al.*, 2005; Carter & Reed, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011).

De acordo com Reed e colaboradores (2009), os adjuvantes podem ser classificados conforme sua origem, propriedades físico-químicas ou mecanismo de ação. Duas classes encontradas nos estudos modernos em vacinas são:

- Imunoestimulantes: adjuvantes que atuam diretamente no sistema imune para aumentar a resposta a antígenos. Exemplos: ligantes de *Toll-like receptors* (TLR's), citocinas, saponinas e exotoxinas bacterianas;
- Veículos: apresentam antígenos vacinais ao sistema imune de maneira ótima. Exemplos: sais minerais, emulsões, lipossomos, virossomos e microesferas de polímeros biodegradáveis.

A ação inicial da imunidade inata é crucial para o grau e tipo de respostas de células T e B antígeno-específicas (Wack & Rappuoli, 2005) e os adjuvantes se

favorecem dessa atuação para formar a resposta imune a antígenos (Carter & Reed, 2010). Nesse contexto, os receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, dentre eles os TLR's, são importantes alvos para adjuvação pelo seu grande potencial de manipular a resposta imune (Wack & Rappuoli, 2005). A interação entre esses receptores e esses padrões inicia uma cascata de sinalização intracelular para a produção de citocinas e quimiocinas que medeiam a indução de respostas inflamatórias e antimicrobianas e, conseqüentemente, ativam uma resposta imune adaptativa específica (Perrie, *et al.*, 2008; Raman *et al.*, 2012).

Motivos dinucleotídeos CpG não metilados, presentes no DNA bacteriano, são reconhecidos pelo TLR-9 que é expresso em células B, macrófagos e células dendríticas, provocam a ativação do sistema imune inato e a produção de citocinas e quimiocinas (Okwor & Uzonna, 2009; Steinhagen *et al.*, 2011). Esses motivos CpG bacterianos promovem uma forte resposta imune celular do tipo Th1, linfócitos T citotóxicos, células NK e produção de anticorpos (Reed *et al.*, 2008). Oligodeoxinucleotídeos sintéticos contendo motivos CpG podem mimetizar o DNA bacteriano e têm sido empregados como adjuvante para vacinas e agente terapêutico (Flynn *et al.*, 2005; Steinhagen *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2012).

Para o desenvolvimento de uma vacina humana ideal contra leishmaniose, que seja segura, induza a proteção por um longo período com o mínimo de imunizações e que promova a proteção cruzada contra as diferentes espécies, é importante que antígenos protetores sejam caracterizados (Coler & Reed, 2005). Embora as informações sobre os estágios de vida do parasito sejam abundantes, existam centenas de antígenos candidatos, incluindo moléculas de superfície, descritos (Singh & Sundar, 2012) e diferentes formulações e estratégias de imunização terem sido utilizadas, ainda não existe uma vacina que promova proteção sólida contra LC. Dada a importância epidemiológica global da LC, a busca por novas ferramentas que visam auxiliar no controle e terapêutica da doença podem contribuir para a minimização do impacto dessa patologia. Tendo como base estudos anteriores do nosso grupo, nos quais foram encontradas diferenças no perfil de expressão das proteínas Lb1 e Lb2 no mapa proteômico de cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas a diferentes manifestações clínicas da LTA (Cuervo *et al.*, 2007 e dados não publicados), tais proteínas foram selecionadas como candidatas para esse trabalho. Uma vez que levamos em conta o destaque desta espécie no

cenário epidemiológico nacional e da América Latina, além da relevância das características antigênicas que possam estar relacionadas aos diferentes espectros da doença. Portanto, neste estudo avaliamos a imunogenicidade e eficácia protetora de duas moléculas de *L. (V.) braziliensis*, expressas pelo nosso grupo, nos modelos camundongo BALB/c e hamster dourado, desafiados com *L. (V.) braziliensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Clonar, expressar e purificar duas proteínas (Lb1 e Lb2) de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e avaliar a imunogenicidade e o potencial destas proteínas como antígenos vacinais.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonar, expressar e purificar proteínas de *L. (V.) braziliensis*;
- Obter de anticorpos policlonais anti-*Leishmania*;
- Inocular camundongos BALB/c e hamsters dourados com as proteínas recombinantes purificadas em diferentes formulações;
- Avaliar a proteção induzida pela imunização com o desafio com promastigotas infectantes de *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar a imunogenicidade das formulações utilizando ELISA e citometria de fluxo nas amostras biológicas dos animais imunizados, determinando o fenótipo/frequência das células T induzidas e resposta funcional pela secreção de citocinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de promastigotas

A cepa MHOM/BR/2000/LTCT13490 de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, foi obtida da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). As formas promastigotas foram cultivadas a 25°C em meio bifásico NNN (meio Novy e McNeal modificado por Nicolle) e Schneider (Vitrocell), suplementado com 20% de SFB inativado (Vitrocell) e 2% de urina humana. A manutenção das culturas foi realizada a cada 7 dias de crescimento. A cepa foi mantida infectante através de frequente passagem em hamster.

3.2 Obtenção dos antígenos recombinantes

3.2.1 Expressão das proteínas recombinantes *Lb1r-6xHis* e *Lb2r-6xHis* em larga escala e teste de solubilidade

Os procedimentos de clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes foram realizados em colaboração com o Dr. Marco Alberto Medeiros do Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos (Lb1r) e com a Dra. Leila de Mendonça Lima do Laboratório de Genômica funcional e Bioinformática do IOC (Lb2r).

A expressão das proteínas em larga escala foi realizada após transformação da cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star (Life Technologies) com os plasmídeos comerciais pET100 Direccional TOPO[®] (Life Technologies) (figura 3.1) para Lb1r e pET 28a[®] (Novagen) (figura 3.2) para Lb2r. Os clones recombinantes foram inoculados em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para o vetor pET100 e 30 µg/mL de kanamicina para o vetor pET 28a e incubados a 37°C por 16-18 horas, sob agitação, a 200 rpm. As culturas saturadas foram inoculadas na diluição de 1:100 em 500 mL de meio LB contendo antibiótico e incubadas a 37°C, sob agitação, a 200 rpm. Quando as culturas atingiram absorbância entre 0,4 e 0,6, a 600nm, foi adicionado o agente indutor de expressão IPTG na concentração final de 1 mM e as culturas incubadas por 3 h a 37°C. Foram retiradas duas alíquotas de 2 mL para cada clone e, assim como o restante das culturas, foram centrifugados (4.000 rpm, 20 minutos) e armazenados a -80°C.

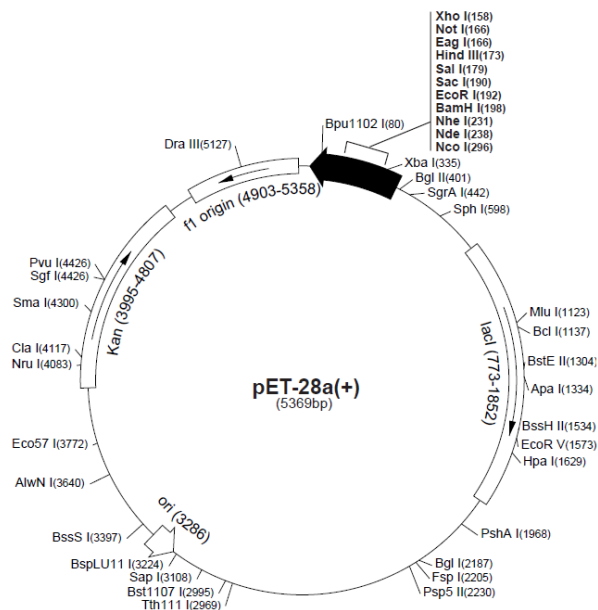


Figura 3.1: Representação esquemática do vetor de expressão pET 28a. A seta preta indica o sítio de clonagem múltipla do vetor; região de origem f1 de replicação; região da sequência codificadora para a resistência à kanamicina (kan); região da sequência codificadora de *lacI*.

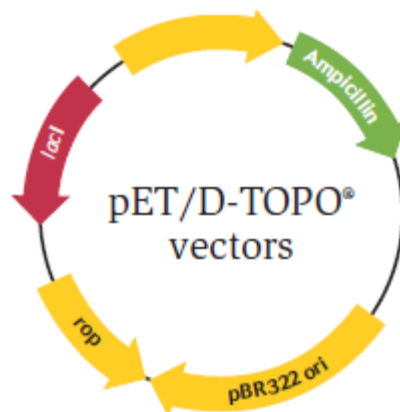


Figura 3.2: Representação esquemática do vetor de expressão pET 100. A seta amarela indica o sítio de clonagem múltipla do vetor; região da sequência codificadora para a resistência à ampicilina; região de origem de replicação pBR322; região da sequência codificadora de *lacI*.

As alíquotas foram utilizadas para teste de solubilidade. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (20 mM Tris, 1 mM EDTA, Triton X-100 0,1%), adicionado 1 mM de inibidor de protease (PMSF, Thermo Scientific) e as amostras sonicadas em gelo com 3 ciclos de 10 segundos e intervalos de 30 segundos entre os ciclos. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas (13.500 rpm, 15 minutos a 4°C), separadas as frações solúvel e insolúvel e analisadas por eletroforese SDS-PAGE 12%. Foram realizados os mesmos procedimentos de lise e

separação das frações com uma alíquota de cultura bacteriana não induzida. Para a realização da eletroforese, as frações solúveis foram precipitadas com 20% de ácido tricloroacético (TCA). Uma alíquota de cada fração, bem como uma alíquota da cultura não induzida, foram diluídas conforme a absorbância obtida de cada cultura após a indução da expressão, de maneira que todas as amostras tivessem a mesma concentração final de bactérias, para garantir que variações de proteínas observadas no gel de SDS-PAGE fossem devido à diferença de expressão. Após a preparação das amostras, foram aplicados 10 µL de cada alíquota, correspondentes a uma $Abs_{600} = 0,1$ D.O. da suspensão bacteriana, em SDS-PAGE. As frações foram congeladas a -80°C até a purificação das proteínas recombinantes.

3.2.2 Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para verificar a expressão, solubilidade e purificação das proteínas recombinantes Lb1r-6xHis e Lb2r-6xHis, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Os géis de concentração e separação foram preparados nas concentrações de 4% e 12%, respectivamente (tabela 3.1), em placas de vidro do sistema vertical Mini-PROTEAN[®] (Bio-Rad). As amostras foram diluídas em tampão de amostra 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol), incubadas a 100°C por 5 minutos e aplicadas nos géis já submersos em tampão de corrida 1X (glicina 0,191 M, Tris base 0,025 M e SDS 0,1% w/v). Além das amostras, foi aplicado padrão de peso molecular (PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific) nos géis. O tempo de corrida foi de aproximadamente 1 hora, com voltagem máxima de 200 V, fornecida pela fonte de energia Bio-Rad PowerPac Basic.

Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie Blue R-250 (0,5% de Coomassie Blue R-250; 50% Etanol, 50% H₂O) e a descoloração para a visualização das bandas foi realizada com solução de etanol 30% e ácido acético 7%.

Tabela 3.1: Reagentes para preparação do SDS-PAGE

Gel de concentração 4%		Gel de separação 12%	
Reagentes	Volume	Reagentes	Volume
H ₂ O	1,2 mL	H ₂ O	1,98 mL
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	500 µL	1,5M Tris-HCl, pH 8,8	1,5 mL
30% acrilamida / 0,8% bis-acrilamida	267 µL	30% acrilamida / 0,8% bis-acrilamida	2,4 mL
10% SDS	20 µL	10% SDS	60 µL
10% APS	20 µL	10% APS	60 µL
TEMED	2 µL	TEMED	6 µL

3.2.3 Lise bacteriana e purificação das proteínas recombinantes

Os vetores do tipo pET, utilizados para a expressão das proteínas recombinantes, possuem uma região para síntese de uma etiqueta de poli-histidina (*His-Tag*), possibilitando a expressão das proteínas fusionadas a uma cauda de 6 histidinas em seqüência na região C- ou N-terminal. Através da técnica de cromatografia por afinidade, as proteínas recombinantes podem ser purificadas das demais proteínas bacterianas, utilizando uma coluna de íons divalentes aos quais essa região de poli-histidina se unirá seletivamente.

Os sedimentos bacterianos de cada clone foram ressuspensos em tampão de lise contendo 1 mM de PMSF e submetidos à lise no sonicador. As amostras foram centrifugadas (Vel. máxima, 4°C, 30 min) e coletadas as frações solúveis. Foi adicionado igual volume de tampão 20 mM Tris, 0,05% Triton X-100, 20 mM Imidazol e as amostras foram filtradas em membranas de 22 µm (Millipore). Tais frações foram armazenadas a -4°C até a purificação (no máximo 3 dias).

As frações solúveis das proteínas Lb1r-6xHis e Lb2r-6xHis foram aplicadas lentamente em coluna HisTrap HP (GE Healthcare) carregada com íons Ni²⁺ para purificação por cromatografia de afinidade. A coluna foi previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (20 mM Tris-HCl, pH 8,0) e a eluição das proteínas retidas por afinidade à coluna foi realizada utilizando o tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1M Imidazol), através do sistema automatizado HPLC - AKTA 100 (GE Healthcare). Foram coletadas frações de 1 mL para análise da purificação por SDS-PAGE.

As frações purificadas tanto da proteína heteróloga Lb1r quanto da Lb2r, foram reunidas em único estoque (*pool*) para cada, dialisadas contra PBS 1X para remoção dos sais utilizados na purificação e quantificadas através de teste fluorimétrico utilizando o Qubit[®] Protein assay kit (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As proteínas foram ainda submetidas à remoção de endotoxina proveniente do sistema de expressão, utilizando o kit comercial Pierce[®] High-Capacity Endotoxin Removal Resin (Thermo Scientific) e a concentração de LPS determinada pelo teste Endosafe[®] - PTS Portable Test System (Charles River Laboratories).

3.3 Produção de anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r

Dez camundongos BALB/c foram hiperimunizados para obtenção de soro policlonal para os dois antígenos recombinantes, conforme tabela 3.2. Os animais foram divididos em dois grupos com 5 camundongos e foram imunizados por via intraperitoneal, com auxílio de seringa de 1 mL e agulha de 13 x 0,38 mm, contendo 100 µL de suspensão. Quinze dias após a última injeção, os animais foram eutanasiados e o sangue total foi coletado por punção cardíaca, com auxílio de seringa de 3 mL. O sangue coletado foi transferido para tubos de microcentrifuga e centrifugado (6.000 rpm, 10 minutos) para obtenção do soro.

Tabela 3.2: Protocolo de imunização dos animais para obtenção de soro policlonal anti-Lb1r e anti-Lb2r

Grupo	1 ^a dose	2 ^a dose	3 ^a dose	4 ^a dose	5 ^a dose
Antígeno Lb1r	10 µg Lb1r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb1r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb1r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb1r + 50 µL adjuvante incompleto de Freud's (Sigma)	10 µg Lb1r
Antígeno Lb2r	10 µg Lb2r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb2r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb2r + 50 µL adjuvante completo de Freud's (Sigma)	10 µg Lb2r + 50 µL adjuvante incompleto de Freud's (Sigma)	10 µg Lb2r

3.4 Obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania*

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* da cepa MHOM/BR/2000/LTCT13490 foram expandidas em garrafas plásticas de cultura

contendo meio Schneider suplementado com 20% de SFB e 2% de urina humana, a partir de culturas no 3º dia de cultivo em meio bifásico, conforme descrição anterior.

Os parasitos foram centrifugados por 10 min a 4.000 rpm e lavados 3 vezes com PBS 1X, nas mesmas condições. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1X contendo coquetel inibidor de proteases Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche), na concentração indicada pelo fabricante. As células foram submetidas a 15 ciclos de ultra-som para a lise celular. Ao final do procedimento o lisado total foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min e reservado o sobrenadante, o qual continha a fração solúvel. As proteínas foram quantificadas em Qubit® e armazenadas a -80°C para uso posterior.

3.5 Western Blotting

As proteínas Lb1r e Lb2r e o antígeno solúvel de *Leishmania* foram submetidos à eletroforese por SDS-PAGE 12% e posteriormente os géis, as membranas de nitrocelulose e os papéis de filtro, foram equilibrados em tampão de transferência gelado (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 20% etanol) por 10 minutos. As proteínas foram eletro-transferidas dos géis SDS-PAGE para as membranas sob voltagem constante de 100 V, por 1 hora, mantendo-se a cuba a 4°C.

As membranas foram bloqueadas por 18 horas a 4°C em tampão TBS 1X (100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) contendo 10% de leite em pó desnatado, lavadas duas vezes, sob agitação, com tampão TBS contendo 0,05% de Tween 20 (TBST) e mais duas vezes com tampão TBS 1X. Foi realizada a incubação das membranas com os soros imunes dos camundongos nas diluições 1:500, 1:2500 e 1:5000, diluídos em tampão TBS contendo 5% de leite em pó desnatado, por duas horas, sob agitação, em temperatura ambiente. Repetiram-se as etapas de lavagens anteriores e o anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado à peroxidase, foi acrescentado na diluição adequada (1:10.000) e a membrana incubada por mais 1 hora em temperatura ambiente.

Após duas lavagens com TBST e com TBS 1X, a reação foi revelada em câmara escura, com o kit comercial SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante e o filme de raio-x exposto à membrana por diferentes períodos de tempo.

3.6 Ensaios de avaliação do potencial vacinal dos antígenos recombinantes

3.6.1 Animais

Quarenta camundongos BALB/c, fêmeas, entre 3 e 4 semanas de vida e 15 hamsters dourados, machos, entre 3 e 4 semanas, foram obtidos do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ). Os animais foram mantidos sob condições apropriadas de temperatura e umidade e receberam ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos de experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA licença Nº. L-0027/07) da FIOCRUZ. Por serem altamente susceptíveis à infecção com *Leishmania*, os hamsters dourados foram incluídos nesse trabalho para os ensaios de proteção.

3.6.2 Preparação das proteínas com adjuvante e imunização dos animais

As proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r purificadas e quantificadas foram formuladas com oligonucleotídeos ricos em sequências CpG (ODN 1826, 5'-tccatgacgttctctgacgtt-3'), apropriados para estímulo da resposta imune celular em modelo murino, obtidos da Invivogen. As suspensões foram preparadas nos dias das imunizações e armazenadas a -4°C até o momento de uso.

Para a imunização, os animais foram agrupados conforme a formulação vacinal utilizada, com 8 camundongos por grupo, assim como 3 hamsters por grupo (Tabela 3.3). Os camundongos e os hamsters foram imunizados com as formulações por via subcutânea, na pata posterior esquerda, com o auxílio de seringa de 1 mL e agulha de 13 x 0,38 mm. Foram realizadas 3 imunizações, com intervalo de 15 dias entre elas (tabela 3.3). Três camundongos de cada grupo foram eutanasiados 15 dias após a última dose de imunização, para avaliação da imunogenicidade dos antígenos recombinantes Lb1r e Lb2r.

Tabela 3.3: Protocolo de imunização dos animais conforme grupo pertencente

Grupo	1ª dose	2ª dose	3ª dose
G1	10 µg Lb1r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb1r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb1r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS
G2	10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS
G3	10 µg Lb1r + 10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb1r + 10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	10 µg Lb1r + 10 µg Lb2r + 20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS
G4	20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS	20 µg CpG-ODN / 50 µL PBS
G5	50 µL PBS	50 µL PBS	50 µL PBS

3.6.3 Desafio com infecção por *L. braziliensis* e acompanhamento das lesões

Cinco camundongos de cada grupo foram anestesiados e desafiados com 10^5 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/98/R69) em 10 µL de PBS estéril, por via intradérmica na orelha esquerda, utilizando-se seringa de insulina de 0,3 mL (BD) e agulha de calibre 29G. No mesmo período, os 3 hamsters de cada grupo foram desafiados com inóculo semelhante aos camundongos, por via subcutânea, na pata posterior esquerda, com auxílio de seringa de 1 mL e agulha de 13 x 0,38 mm.

O tamanho das lesões foi monitorado semanalmente e mensurado utilizando paquímetro digital (Digimess) durante 10 semanas após o desafio.

A linha do tempo do protocolo de desafio e acompanhamento das lesões é ilustrada na figura 3.3.

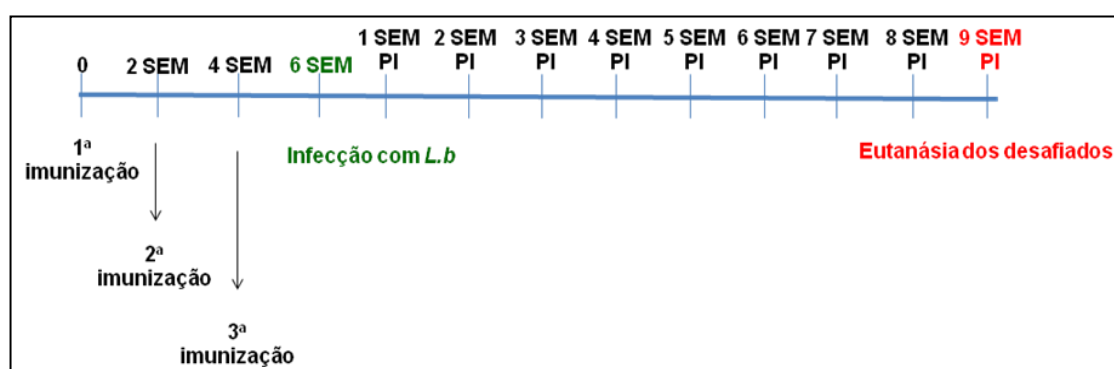


Figura 3.3: Desenho esquemático da linha do tempo do protocolo de desafio, acompanhamento das lesões e eutanásia dos animais desafiados. SEM semana; SEM PI semana pós infecção.

3.7 ELISA

Para avaliação da resposta humoral antígeno-específica, foi realizado ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas G das subclasses IgG1 e IgG2a, nos soros obtidos dos camundongos apenas imunizados e dos camundongos desafiados.

Para a técnica foram utilizadas placas de poliestireno (Nunc, Maxsorp), sensibilizadas com 2 µg/mL de cada antígeno recombinante ou do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), diluídos em tampão de sensibilização (15 mM Na₂CO₃, 34 mM NaHCO₃, pH 9,6), com volume final de 100 µL durante 4 horas. Após a sensibilização as placas foram bloqueadas por 18 horas a 4°C, com tampão de bloqueio (PBS 1X, BSA 1% e Tween 20 0,05%). Para retirada do tampão de bloqueio as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (PBS 1X, Tween 20 0,1%), e incubadas com os soros imunes em diluições seriadas em tampão de incubação (PBS 1X, BSA 0,1% e Tween 20 0,05%) por 2 horas, sob agitação, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com o conjugado marcado com peroxidase, específico para cada subclasse de imunoglobulina pesquisada, diluído 1:5.000 em tampão de incubação, tanto IgG1 quanto IgG2a anti-camundongo. Para a revelação, adicionou-se 100 µL por poço do substrato TMB blue (Dako), incubou-se por 10 minutos e a reação foi interrompida com 100 µL por poço de H₂SO₄ a 1N. Os valores de absorbância foram determinados no leitor de ELISA, no comprimento de onda de 450 nm.

3.8 Avaliação da resposta imune celular

Após a eutanásia dos camundongos, o baço de cada animal foi removido assepticamente e acondicionado em placa de 24 poços estéril (1 órgão/poço). Com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 5 mL, cada órgão foi macerado separadamente em meio RPMI 1640. As células foram transferidas para tubo cônico de 15 mL, o volume da suspensão foi ajustado para 10 mL e as células foram lavadas (1.500 rpm, 10 minutos a 4°C) três vezes. Posterior à última lavagem, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspenso em 1,5 mL de solução para criopreservação (SFB + 10% de DMSO) e as células foram transferidas para tubos de criogenia (Corning) e armazenadas em N₂ líquido até a utilização.

A resposta imune celular foi avaliada através da caracterização fenotípica e do perfil de citocinas por citometria de fluxo multiparamétrica. Para as análises, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, lavadas duas vezes com PBS 1X contendo 10% de SFB e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, penicilina (100U/mL), estreptomicina (10mg/mL) e 0,04 mM 2-mercaptoetanol, este meio denominado RPMI completo. A concentração de células foi ajustada para 1×10^7 células/mL e incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ por 24 horas, na presença ou ausência de estímulo com 10 µg/mL de Lb1r, Lb2r ou SLA e 2 µg/mL de anticorpo para CD28 (BD Biosciences). Adicionou-se 10 µg/mL de Brefeldina A (Sigma) nas últimas 4 horas de incubação para bloquear a secreção das citocinas. O controle de estímulo foi realizado com PMA (20 µg/mL) e Ionomicina (1 µM). A marcação extracelular foi realizada com anticorpos monoclonais anti-CD3 conjugado com o fluoróforo FITC, anti-CD4 e anti-CD8a conjugados ao PERCP (BD Biosciences). Para a marcação das citocinas intracelulares, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit comercial Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences), segundo as orientações do fabricante e foram incubadas com os seguintes anticorpos e respectivos fluoróforos conjugados: anti-TNF APC-Cy, anti-IFN PE-CF594, anti-IL-10 APC, anti-IL-4 PE-Cy7 (BD Biosciences) e anti-IL-13 PE (Affymetrix eBioscience). Como controles negativos foram empregados os respectivos isotipos. As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho CyAn ADP (Dako Cytomation) e analisadas através do software FlowJo V X.07 (Flow Cytometry Analyses Software, Tree Star).

3.9 Análise estatística

Foi realizada a comparação entre os múltiplos grupos utilizando análises de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni como pós-teste. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de $p \leq 0.05$. Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Produção das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r de *L. (V.) braziliensis*

Utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com os diferentes plasmídeos para cada gene, foi realizada a expressão das proteínas de Lb1r e de Lb2r, pela indução com 1 mM de IPTG por 3 h. Como controle da não indução, uma colônia de cada alvo foi cultivada nas mesmas condições que as colônias induzidas, mas sem a adição de IPTG. Os resultados da expressão de cada proteína foram analisados por meio de SDS-PAGE 12%, como pode ser visualizado na figura 4.1A e B. As proteínas recombinantes foram identificadas pela coincidência das bandas observadas com as massas moleculares previstas de aproximadamente 23 kDa para Lb1r e 19 kDa para Lb2r. Apesar das proteínas terem sido identificadas neste trabalho manteremos a nomenclatura Lb1 e Lb2 por questões de propriedade intelectual que poderão ocorrer a partir deste estudo. Observa-se uma nítida superexpressão das proteínas heterólogas, quando comparadas com o controle não induzido. Lb1r foi expressa em maior quantidade de maneira solúvel (Figura 4.1A) enquanto Lb2r foi similarmente expressa nas frações solúvel e insolúvel (Figura 4.1B).

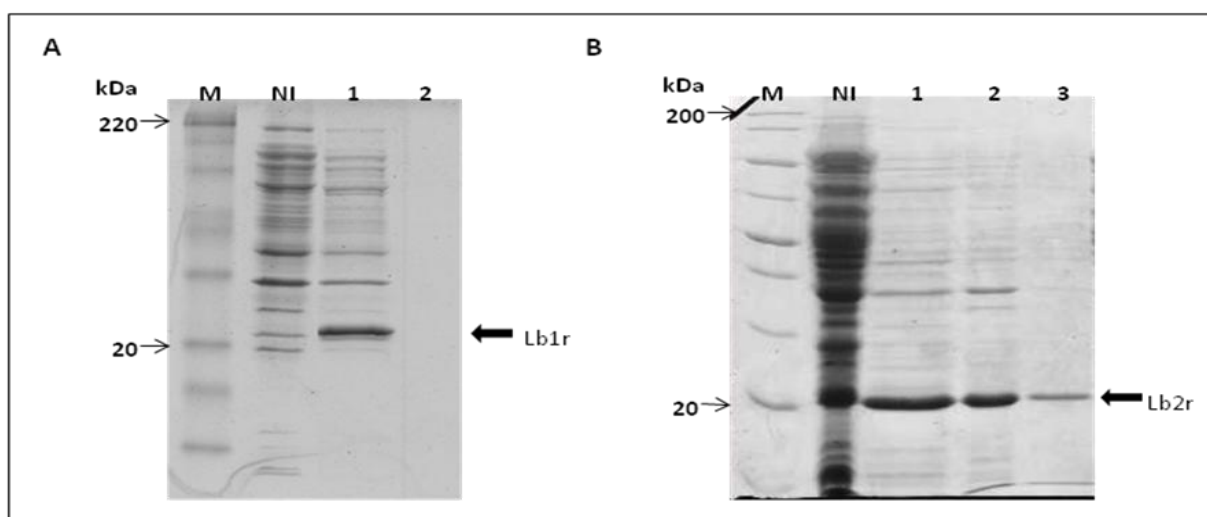


Figura 4.1: Análise da expressão e solubilidade das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r. SDS-PAGE 12%. **(A)** Lb1r. Poço M – padrão de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Life technologies); Poço NI amostra não induzida; Poço 1 – fração solúvel; Poço 2 – fração insolúvel. **(B)** Lb2r. Poço M – padrão de peso molecular PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); Poço NI - amostra não induzida; Poço 1 – lisado total das células bacterianas; Poço 2 – fração insolúvel; Poço 3 – fração solúvel.

As frações solúveis das duas proteínas recombinantes foram aplicadas em colunas HisTrap HP (GE), carregadas com íons de níquel e submetidas à purificação por cromatografia de afinidade com aumento gradativo da concentração de imidazol até atingir 1 M. Foram recolhidas frações a cada diferente concentração do eluente e analisadas por SDS-PAGE 12% para a detecção de Lb1r (Figura 4.2A) e Lb2r (Figura 4.2B) purificadas. Após serem reunidas em *pool* e dialisadas, as proteínas foram submetidas à remoção de LPS bacteriano e consideradas virtualmente livres de endotoxina (>10 Unidades de endotoxina por mg de proteína) e quantificadas em Qubit®.

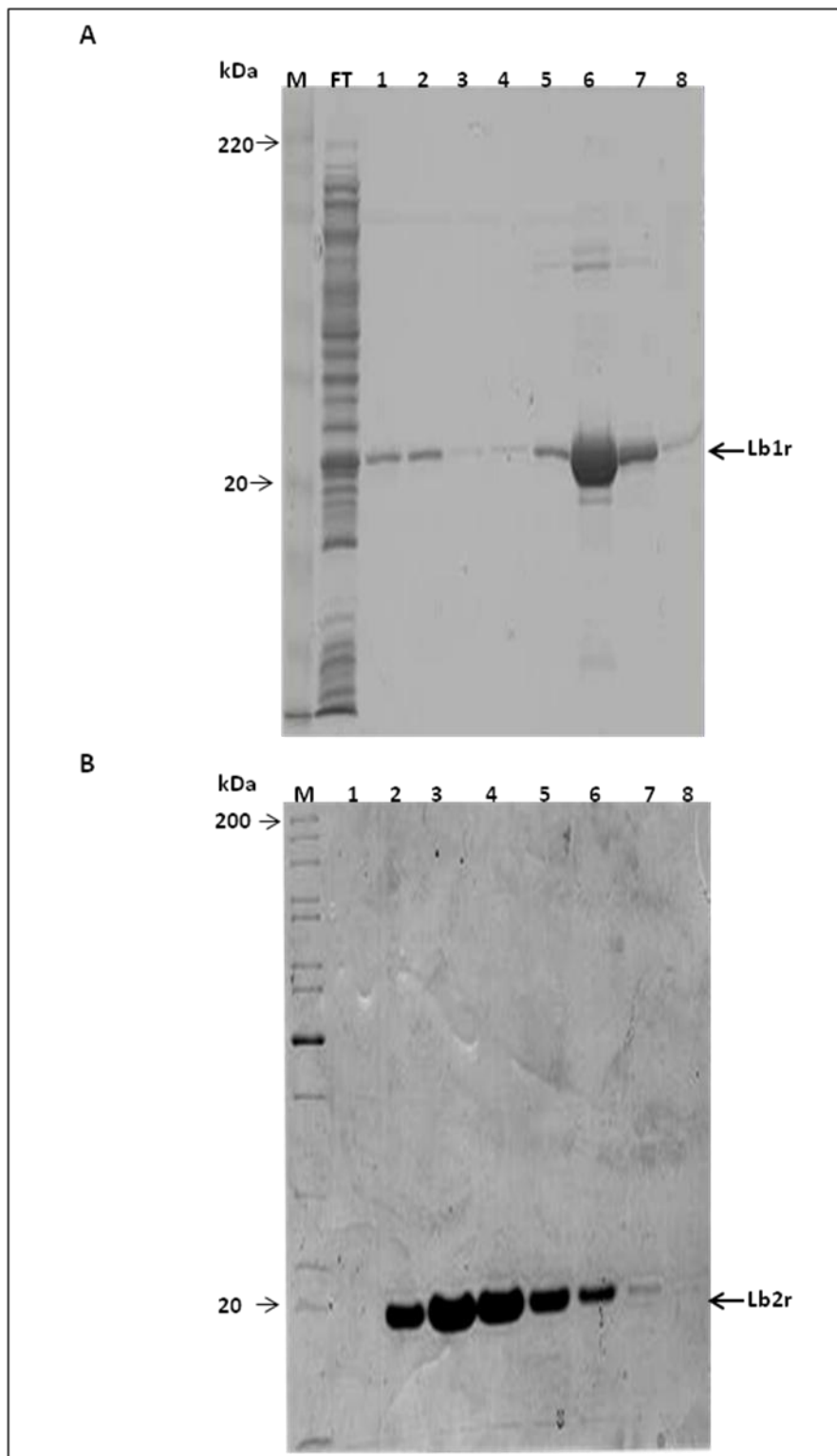


Figura 4.2: Análise da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes Lb1r e Lb2r. SDS-PAGE 12%. **(A)** Proteína Lb1r. Poço M – padrão de peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (Life technologies); poço FT – *flow through*, eluato referente às proteínas que não se ligaram na coluna; poços 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – frações onde se obteve a proteína eluída. **(B)** Proteína Lb2r. Poço M – padrão de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific); poços 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – frações onde se obteve a proteína eluída.

4.2 Obtenção de anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r

Dez camundongos BALB/c foram imunizados com as proteínas recombinantes, sendo 5 animais com Lb1r e 5 com Lb2r. Após a imunização, a análise dos anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r foi realizada por meio de *western blotting* contra as respectivas proteínas recombinantes (Figuras 4.3A e C) e contra antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (Figuras 4.3B e D). Os anticorpos específicos para cada proteína revelaram bandas únicas com os pesos moleculares esperados. Os soros foram titulados e armazenados para experimentos posteriores.

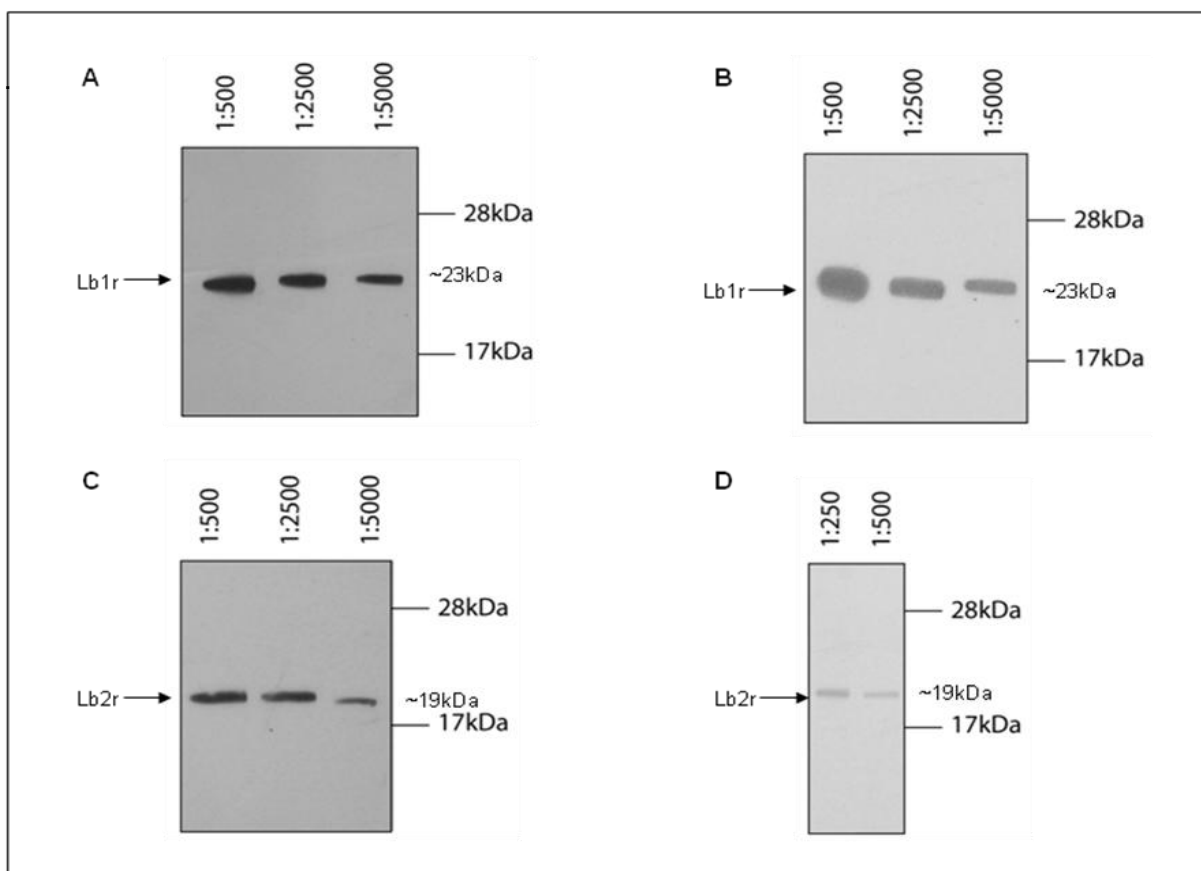


Figura 4.3; Titulação dos anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r. Análise da titulação dos anticorpos policlonais anti-Lb1r e anti-Lb2r por *western blotting*. As diluições estão descritas acima de cada poço em todos os painéis. O padrão de peso molecular foi o *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) **(A)** Titulação do anticorpo policlonal anti-Lb1r contra a proteína recombinante Lb1r. **(B)** Titulação do anticorpo policlonal anti-Lb1r contra o antígeno solúvel de *Leishmania*. **(C)** Titulação do anticorpo policlonal anti-Lb2r contra a proteína recombinante Lb2r. **(D)** Titulação do anticorpo policlonal anti-Lb2r contra o antígeno solúvel de *Leishmania*.

4.3 Imunização e avaliação da proteção contra a infecção com *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c e hamsters dourados

Neste estudo, 40 camundongos BALB/c e 15 hamsters dourados foram imunizados com a formulação vacinal conforme o grupo pertencente, de acordo com o desenho experimental descrito na seção de material e métodos. Após a imunização, 15 camundongos foram eutanasiados para ensaios de imunogenicidade. Os 25 animais restantes, bem como todos os hamsters, foram inoculados com 10^5 promastigotas infectantes de *L. (V.) braziliensis* e o curso da infecção nos animais foi acompanhado por 8 semanas (Figura 4.4). Todos os animais, incluindo camundongos e hamsters, apresentaram lesões mensuráveis que surgiram a partir da 3ª semana pós-infecção. Os camundongos apresentaram lesão primária de natureza pápulo-eritematosa que evoluiu para uma nodulação ulcerada entre 5 e 7 semanas pós-infecção. As lesões dos camundongos foram classificadas por *score* de 0.0 a 8.0, de acordo com o grau de gravidade (Figura 4.5A e B), conforme descrito por Schuster e colaboradores (2014) e representado na Tabela 4.1. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos, mas o grupo que recebeu as duas proteínas mais CpG exibiram lesões menores (Figura 4.4) e menos graves (Figura 4.5) no tempo de 7 semanas após a infecção. As lesões dos hamsters evoluíram com aumento do inchaço, gradativamente, até a 8ª semana pós-infecção (Figura 4.6A). Os valores de inchaço foram calculados subtraindo a medida da pata traseira direita de cada animal, utilizada como controle. Os animais apresentaram lesão necrótica no sítio de inoculação (Figura 4.6B) e visceralização dos parasitas (Figura 4.6C), que foram isolados em cultura a partir do baço dos animais.

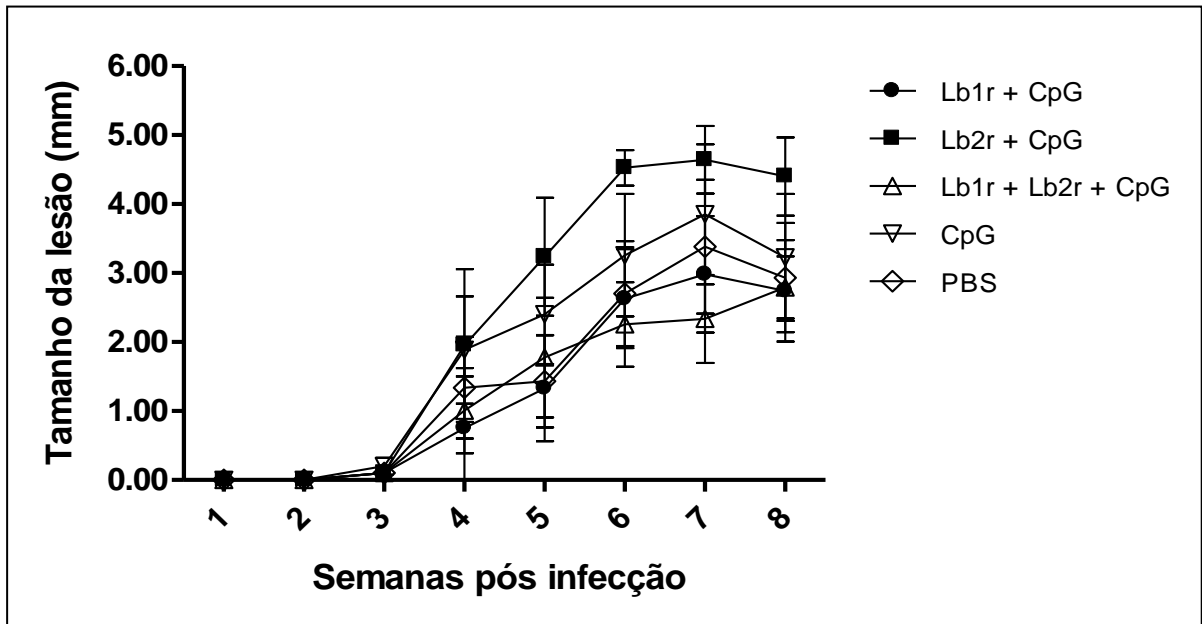


Figura 4.4: Decurso da infecção dérmica pela *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c, após a imunização. Os animais foram inoculados com 10^5 promastigotas de culturas *in vitro*. Média do tamanho da lesão dos animais de cada grupo (\pm SEM).

Tabela 4.1: Classificação por score das lesões dos camundongos

Medida da lesão e característica da lesão	Score atribuído
Eritema	0.5
Pápula	1.0
Lesão de 2,00 a 2,49 mm	2.0
Lesão de 2,50 a 2,99 mm	2.5
Lesão de 3,00 até 5,50 mm	aumenta 0.5 acompanhando o tamanho da lesão até 5.5
Primeiro sinal de necrose	6.0
Necrose severa	7.0
Necrose com perda de tecido	8.0

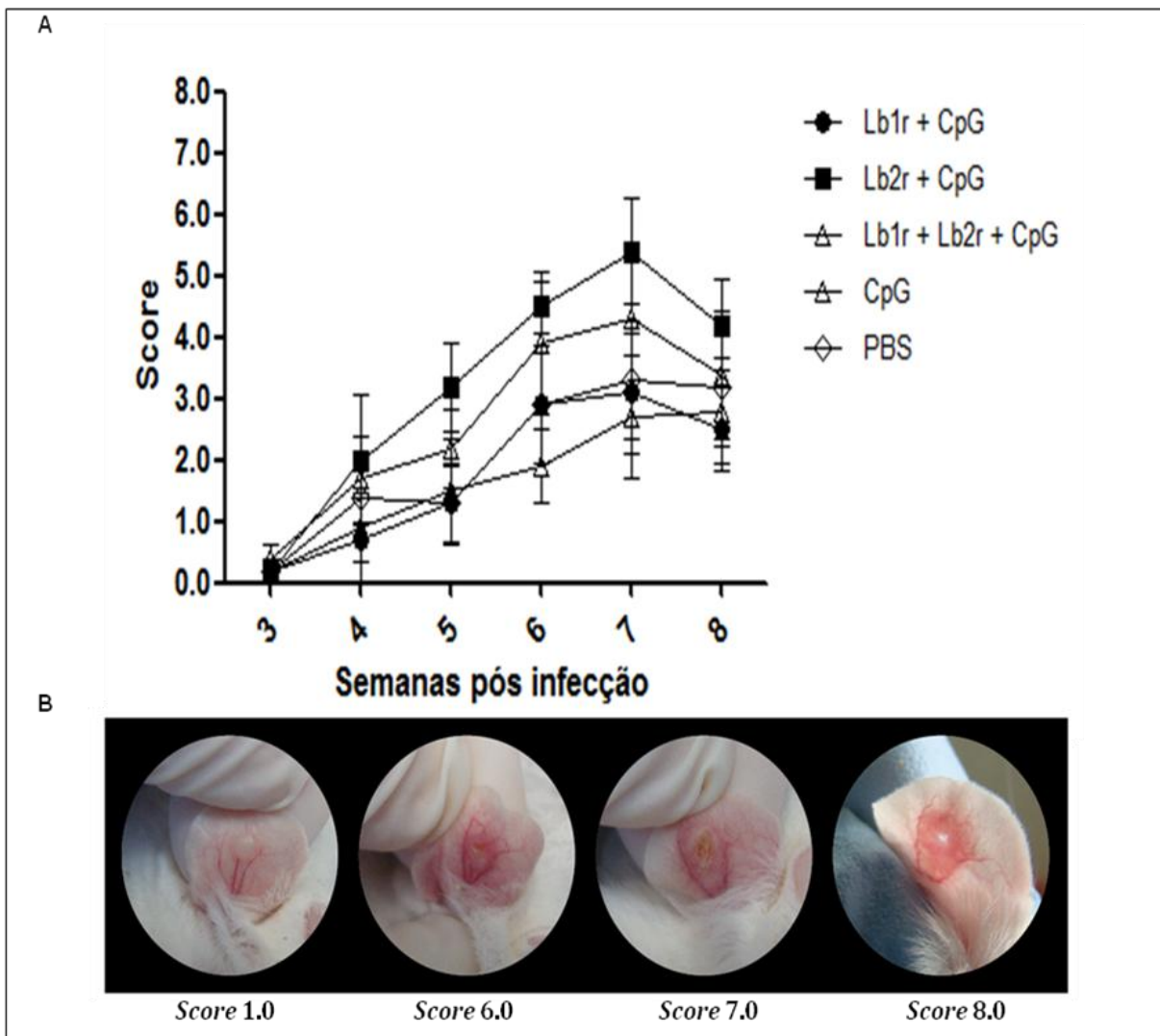


Figura 4.5: Gravidade das lesões dérmicas dos camundongos BALB/c desafiados com *L. (V.) braziliensis*, no decorrer da infecção. (A) A gravidade das lesões apresentadas foi classificada conforme score, durante o curso da infecção. Média dos scores das lesões dos animais de cada grupo (\pm SEM). **(B)** Fotografias ilustrando o aspecto de classificação da lesão: score 1.0 lesão sob a forma de pápula; score 6.0 lesão com a primeira evidência de necrose; score 7.0 lesão necrótica severa; e score 8.0 lesão necrótica severa com perda de tecido.

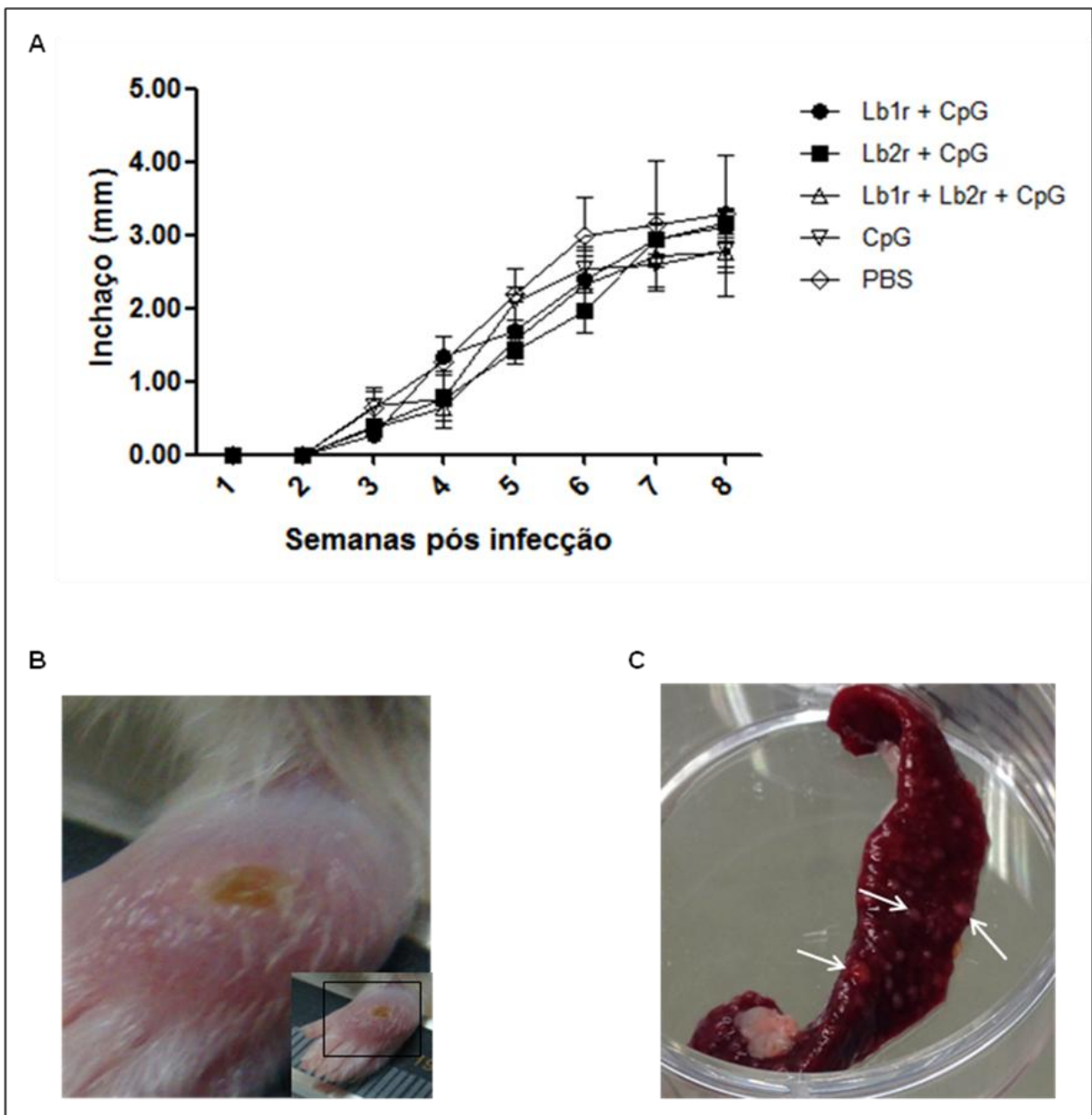


Figura 4.6: Avaliação do curso clínico e patológico das lesões de pele de hamsters dourados desafiados com *L. (V.) braziliensis*. Os animais foram inoculados com 10^5 promastigotas de culturas *in vitro*. **(A)** Decurso da infecção durante 8 semanas. Média \pm SEM são representados. **(B)** Aspecto macroscópico da pata infectada na 8ª semana. Imagem representativa da lesão localizada no sítio de inoculação dos parasitas (face dorsal da pata traseira esquerda). **(C)** Fotografia representativa do baço de animal infectado. As setas brancas indicam alguns dos diversos nódulos encontrados no baço infectado.

4.4 Avaliação da imunogenicidade das formulações vacinais utilizadas

Placas de ELISA sensibilizadas com Lb1r, Lb2r ou SLA foram incubadas com os soros de 3 camundongos de cada grupo experimental, antes do desafio, para análise dos níveis de anticorpos subclasses IgG1 e IgG2a gerados pelas imunizações.

Os animais dos três grupos imunizados (G1, G2 e G3) apresentaram níveis aumentados de IgG1 e IgG2a contra Lb1r (Figura 4.7A), enquanto somente os grupos que receberam Lb2r na formulação vacinal apresentaram aumento no nível das imunoglobulinas específicas para esse antígeno, em comparação ao G4 (Figura 4.7B). A resposta de anticorpos contra SLA foi predominantemente do isotipo IgG2a para os animais dos três grupos imunizados (Figura 4.7C). A tabela 4.2 apresenta os valores de p dos níveis de imunoglobulinas dos grupos em relação ao G4. Os grupos que receberam as formulações contendo antígeno único apresentaram resposta humoral específica (Figura 4.8A e B). Já o grupo que recebeu a formulação contendo os dois antígenos recombinantes exibiu níveis aumentados de anticorpos para ambos os antígenos (Figura 4.8A e B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as subclasses nos grupos. Porém, quando em placa sensibilizada com SLA, todos os grupos que receberam as formulações vacinais apresentaram resposta humoral predominante do isotipo IgG2a ($p < 0.001$ comparados com IgG1 do mesmo grupo) (Figura 4.8C).

Tabela 4.2: Valores de p nos níveis de imunoglobulinas dos animais, conforme antígeno utilizado, em comparação aos animais do grupo G4.

Grupos	IgG1			IgG2a		
	Lb1r	Lb2r	SLA	Lb1r	Lb2r	SLA
G1	$p < 0.001$			$p < 0.001$		$p < 0.001$
G2	$p < 0.05$	$p < 0.001$		$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
G3	$p < 0.001$	$p < 0.001$		$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

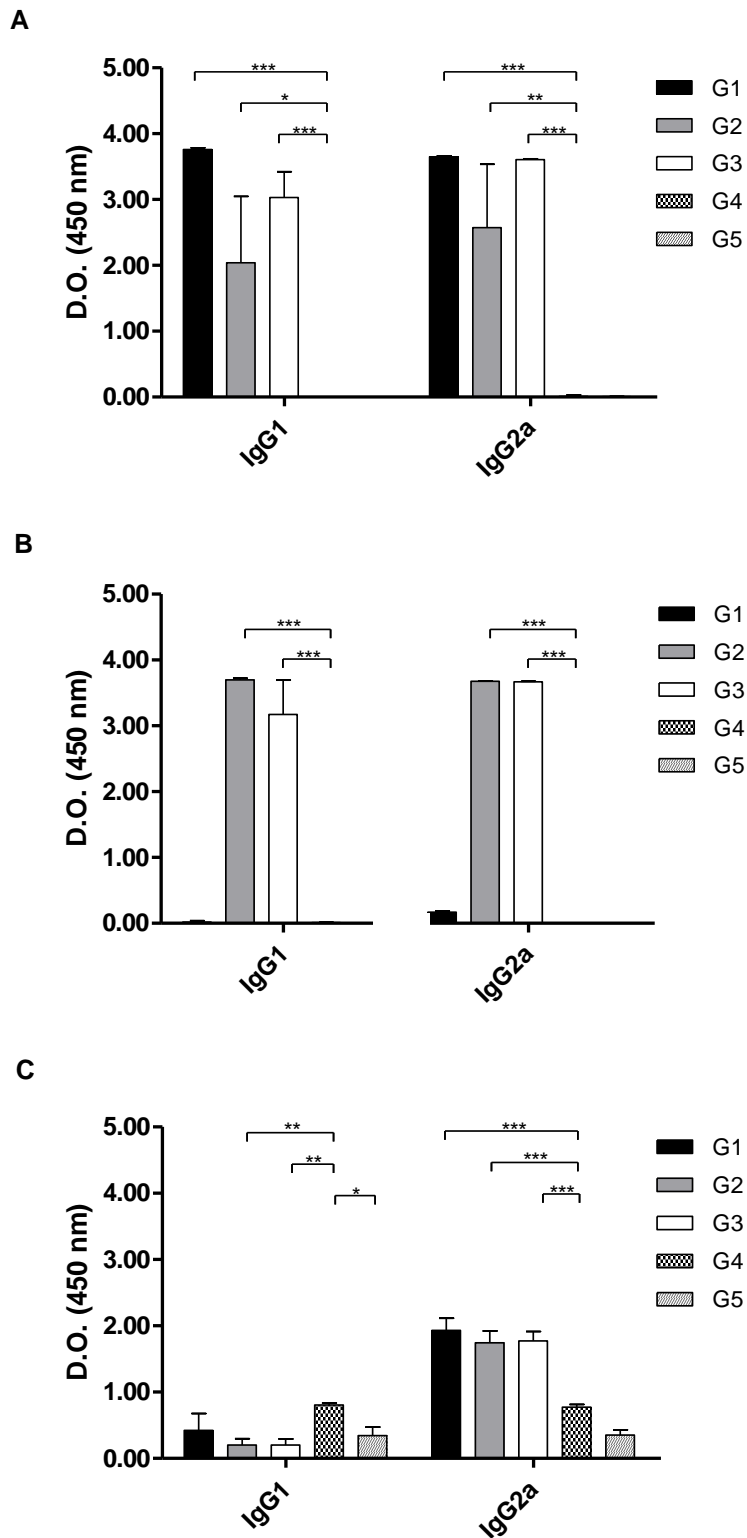


Figura 4.7: Resposta imune humoral elicitada nos grupos de camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio. Foram utilizados 3 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Anticorpos anti-Lb1r. Diluição de 1:80. **(B)** Anticorpos anti-Lb2r. Diluição de 1:80. **(C)** Anticorpos contra SLA. Diluição de 1:40. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na densidade óptica nos níveis de IgG1 e IgG2a entre os grupos vacinados e o grupo G4 (controle CpG).

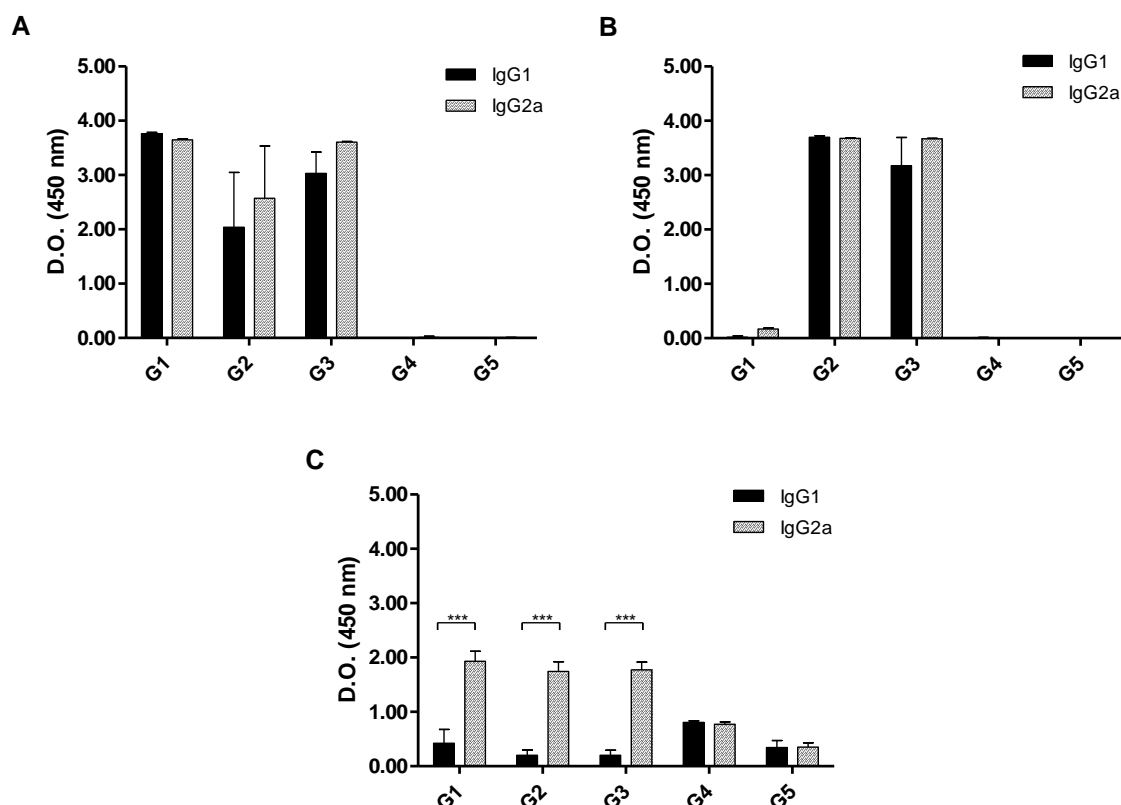


Figura 4.8: Subclasses de imunoglobulinas G geradas pela imunização de camundongos BALB/c com as diferentes formulações vacinais, antes do desafio. Foram utilizados 3 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a contra Lb1r. Diluição de 1:80. **(B)** Níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a contra Lb2r. Diluição de 1:80. **(C)** Níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a contra SLA. Diluição de 1:40. As amostras foram obtidas duas semanas após a 3ª imunização e individualmente testadas por ELISA. Média + SEM são mostrados. *** $p < 0.001$; aumento significativo na densidade óptica entre os níveis de IgG1 e IgG2a dentro do grupo.

4.5 Perfil fenotípico de linfócitos e frequência de células produtoras de citocinas em camundongos BALB/c imunizados

As células do baço dos camundongos BALB/c foram utilizadas para a avaliação da resposta imune celular gerada pelas formulações vacinais. O perfil fenotípico das células e a produção de citocinas intracelular foram analisados após o estímulo das células em cultura (antígeno específico de imunização, SLA ou mitógeno) ou das células sem estímulo. A frequência da população de linfócitos T (CD3⁺) tipo CD4⁺ foi de aproximadamente 80% ao passo que a frequência de células T tipo CD8⁺ foi 15% em todos os grupos experimentais (Figura 4.9).

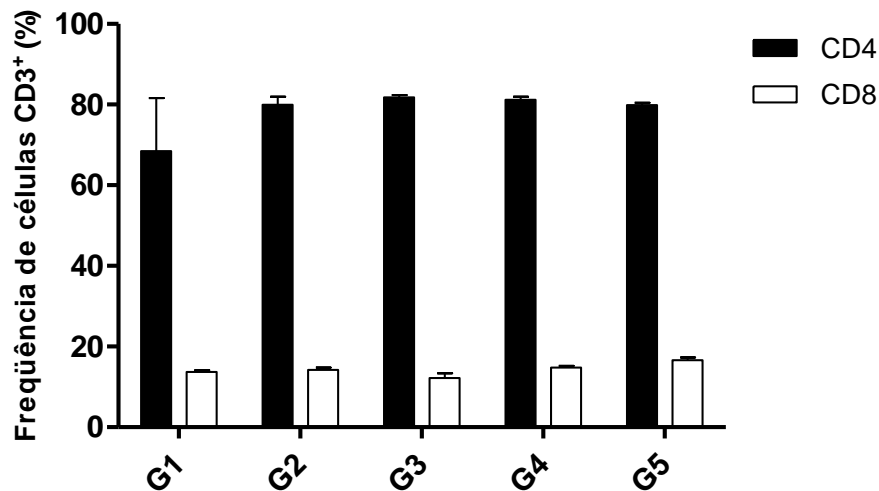


Figura 4.9: Perfil fenotípico da resposta imune celular de camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizadas a células do baço de 3 animais em cada grupo. Frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ dos animais dos grupos experimentais (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS).

A avaliação das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa nas células com estímulo antigênico específico ou com SLA para a produção de IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13, em todos os grupos. Observamos diferença na produção de TNF somente nas células estimuladas com mitógenos comparadas com as células sem estímulo (Figuras 4.10A-E). Não houve diferença na frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de citocinas, com estímulo antigênico específico ou com SLA em todos os grupos. As células estimuladas com mitógenos apresentaram diferença estatística na produção de IFN- γ nos grupos G1 e G3 ($p < 0.001$ e $p < 0.05$ respectivamente) e IFN- γ ($p < 0.001$) e TNF ($p < 0.05$) nos grupos G2, G4 e G5, comparados com as células sem estímulo (Figuras 4.11A-E). A análise da razão entre a frequência de células T IFN- γ^+ / IL-4⁺, entre células T IFN- γ^+ / IL-10⁺ e entre as células T IFN- γ^+ / IL-13⁺, com estímulo antigênico específico, também não evidenciou diferença entre elas (Figuras 4.12A-C). Porém, quando estimuladas com SLA (Figuras 4.12D-F), houve um aumento na razão IFN- γ / IL-10 no grupo G3 em comparação ao G4 ($p < 0.05$) (Figura 4.12E).

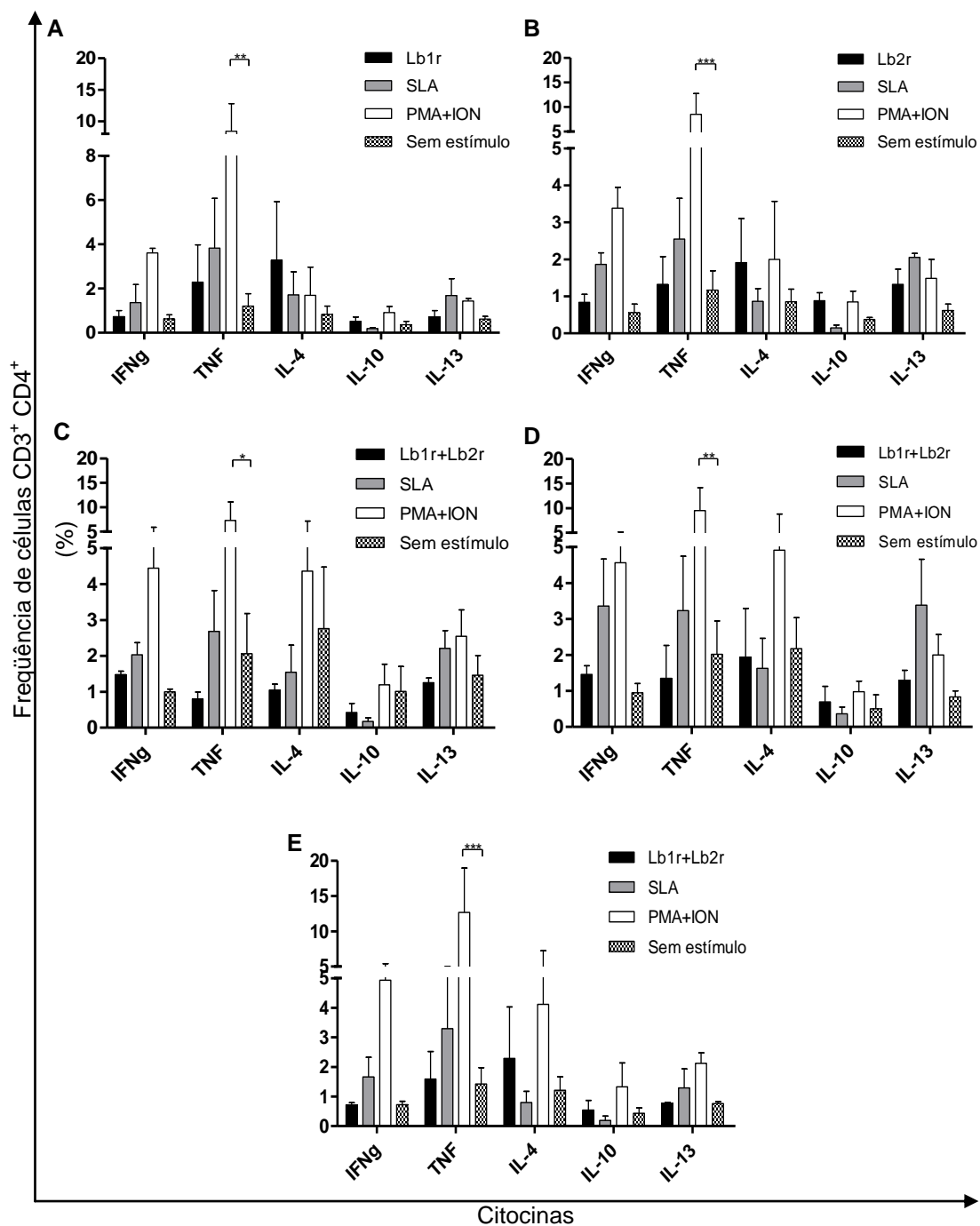
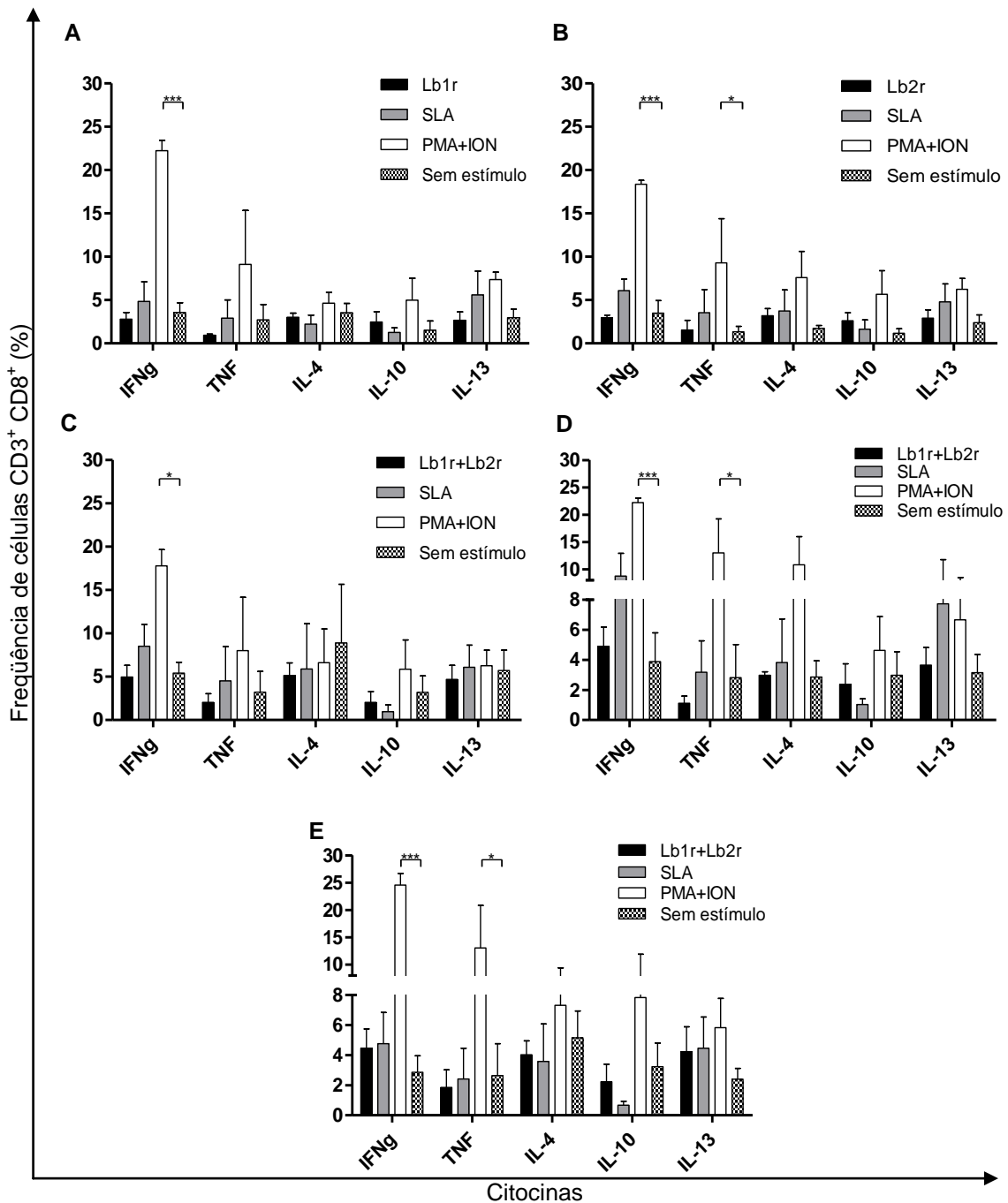


Figura 4.10: Produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 3 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Frequência dos linfócitos T CD4⁺ e citocinas produzidas nas células dos animais do grupo G1, com estímulo antígeno-específico por Lb1r; **(B)** nas células dos animais do grupo G2, com estímulo antígeno-específico por Lb2r; **(C)** nas células dos animais do grupo G3, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; **(D)** nas células dos animais do grupo G4, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; **(E)** e nas células dos animais do grupo G5, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r. Média + SEM são mostrados. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na frequência dos linfócitos T CD4⁺.



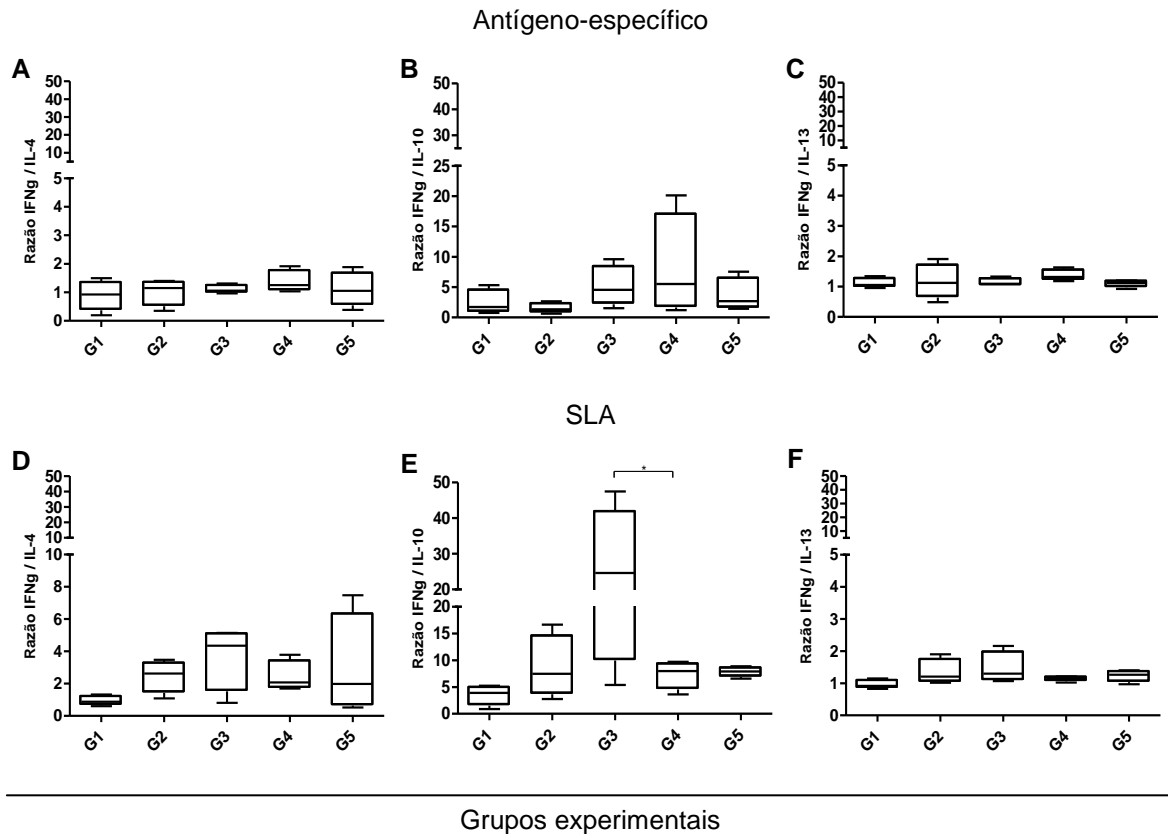


Figura 4.12: Razão entre a porcentagem de linfócitos T $\text{IFN-}\gamma^+$ e as citocinas IL-4^+ , IL-10^+ e IL-13^+ , do baço dos camundongos BALB/c imunizados, antes do desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 3 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A-C)** Frequência dos linfócitos T estimulados com antígeno-específico; **(D-F)** ou estimulados com SLA. As barras representam valores mínimos e máximos. * $p < 0.05$; aumento significativo na razão entre as frequências dos linfócitos T no grupo G3 em comparação ao G4.

4.6 Avaliação da resposta imune humoral e celular após desafio com *L. (V.) braziliensis*

Amostras de soro de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *L. (V.) braziliensis* foram testadas por ELISA para resposta humoral específica de subclasses de IgG1 e IgG2a anti-Lb1r, anti-Lb2r e contra SLA.

Em comparação ao grupo controle G4, todos os grupos imunizados com as diferentes formulações vacinais apresentaram níveis superiores de IgG2a anti-Lb1r ($p < 0.001$ para G1 e G3; $p < 0.05$ para G2) (Figura 4.13A). Enquanto os grupos G2 e G3 exibiram aumento tanto de IgG1 quanto de IgG2a anti-Lb2r ($p < 0.001$ comparado com G4) (Figura 4.13B). Os níveis de IgG2a no grupo G1 foram menores em comparação ao G4 ($p < 0.05$) e elevados em G4 em relação ao G5 ($p < 0.05$)

(Figura 4.13C). Todos os grupos apresentaram produção de IgG1 e IgG2a específica para Lb1r, contudo os grupos controle G4 e G5 exibiram um predomínio do isotipo IgG1 ($p < 0.01$ para G4 e $p < 0.05$ para G5, comparados com IgG2a do respectivo grupo) (Figura 4.14A). Os níveis de anticorpos anti-Lb2r foram aumentados nos grupos G2 e G3, com G3 apresentando predominantemente o isotipo IgG2a ($p < 0.01$ comparado com IgG1 do mesmo grupo) (Figura 4.14B). Todos os grupos também tiveram anticorpos contra SLA, porém sem diferença estatística entre as subclasses (Figura 4.14C).

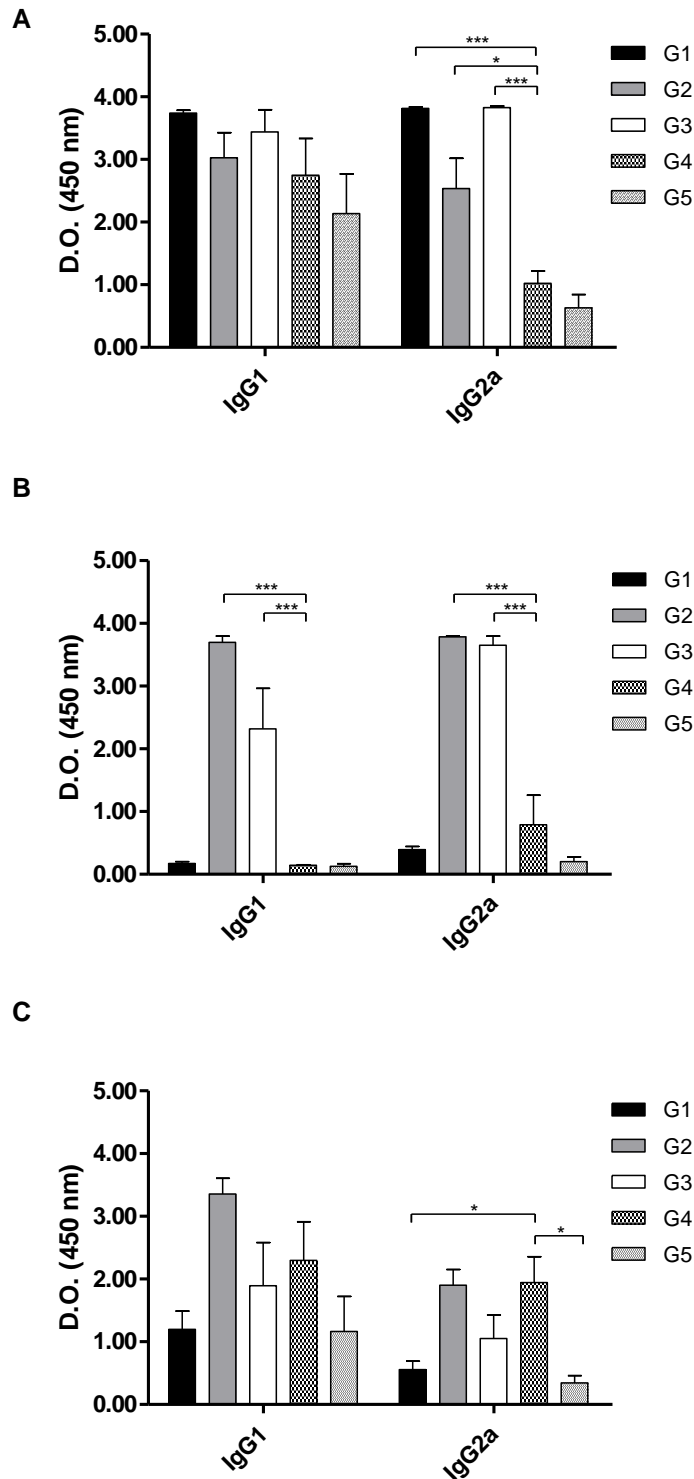


Figura 4.13: Representação gráfica dos níveis das subclasses de IgG1 e IgG2a em camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais após desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Anticorpos anti-Lb1r. Diluição de 1:80. **(B)** Anticorpos anti-Lb2r. Diluição de 1:80. **(C)** Anticorpos contra SLA. Diluição de 1:80. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; aumento significativo na densidade óptica nos níveis de IgG1 e IgG2a entre os grupos vacinados e o grupo G4 (controle).

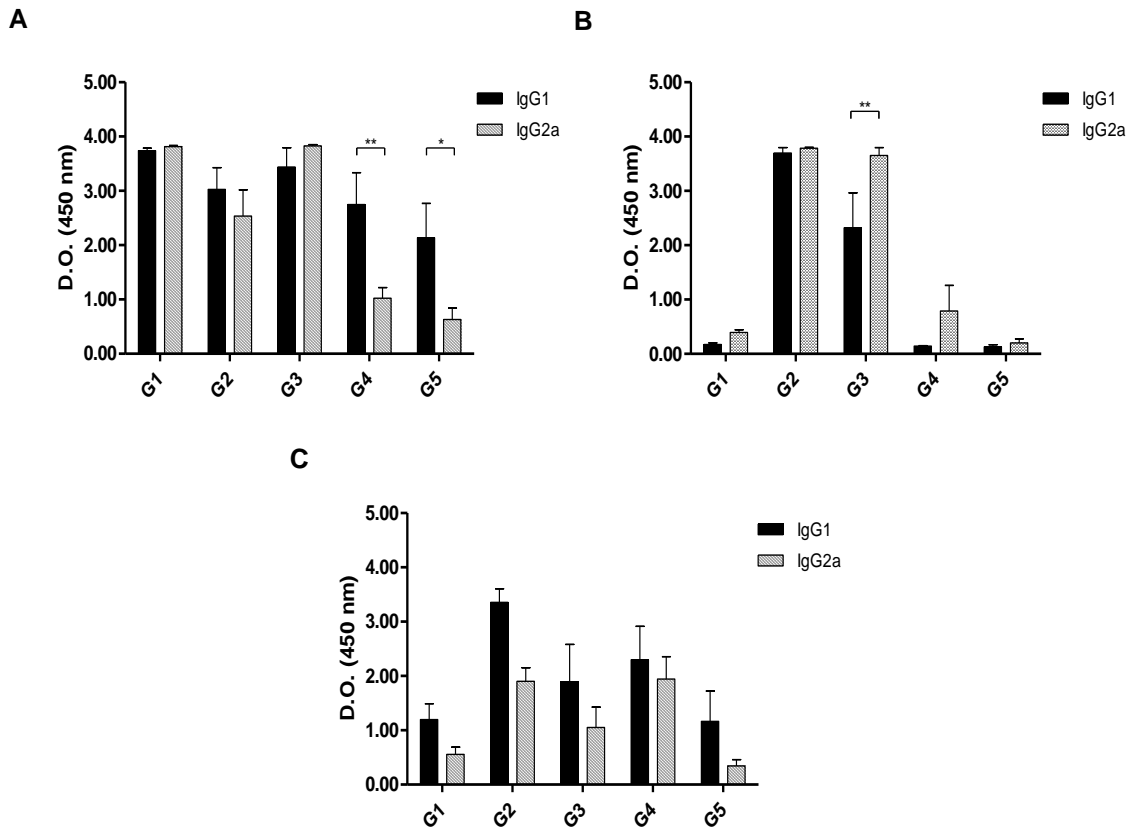


Figura 4.14: Resposta humoral gerada em camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais, após desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Anticorpos IgG1 e IgG2a contra Lb1r. Diluição de 1:80. **(B)** Anticorpos IgG1 e IgG2a contra Lb2r. Diluição de 1:80. **(C)** Anticorpos IgG1 e IgG2a contra SLA. Diluição de 1:80. As amostras foram obtidas nove semanas após desafio e individualmente testadas por ELISA. Média + SEM são mostrados. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na densidade óptica entre os níveis de IgG1 e IgG2a dentro do grupo.

A análise da frequência de linfócitos T no baço dos camundongos BALB/c desafiados com *L. (V.) braziliensis* revelou uma população CD4⁺ de aproximadamente 80% e uma de CD8⁺ de 15% (Figura 4.15).

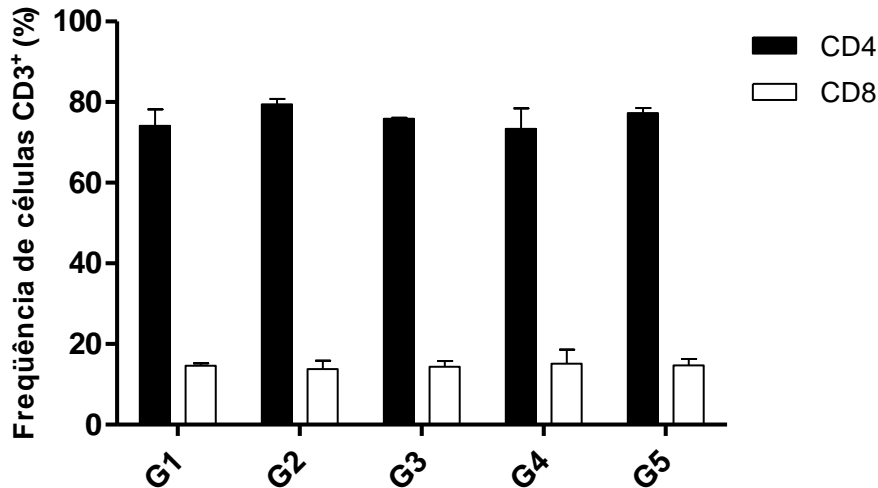


Figura 4.15: Perfil fenotípico da resposta imune celular de camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações vacinais, após o desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizadas as células do baço de 5 animais em cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). Frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ dos animais dos grupos experimentais.

Assim como os animais que foram eutanasiados antes do desafio, A frequência das células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13 nos animais desafiados não foi diferente nas culturas com estímulo antigênico específico ou com SLA em todos os grupos. As células estimuladas com mitógenos apresentaram diferença nos níveis de TNF em comparação às células em estímulo, dos quais G1, G3 e G4 $p < 0.001$, G2 $p < 0.05$ e G5 $p < 0.01$. Houve também o aumento dos níveis de IFN- γ nas células do controle positivo de estímulo nos grupos G3 e G4 ($p < 0.05$), em relação ao controle negativo (Figuras 4.16A-E) e de IL-10 no G3 ($p < 0.05$). A frequência das células T CD8⁺ produtoras de citocinas foi diferente somente nas células estimuladas por mitógenos em todos os grupos, quando comparada com o controle negativo. Contudo, em G1, assim como em G5, os níveis de IFN- γ ($p < 0.01$), TNF ($p < 0.01$) e IL-10 ($p < 0.05$) foram aumentados (Figuras 4.17A-E). A razão entre a frequência de células T IFN- γ^+ / IL-4⁺, entre células T IFN- γ^+ / IL-10⁺ e entre as células T IFN- γ^+ / IL-13⁺ foi estatisticamente similar em todos os grupos e estímulos antigênicos (Figura 4.18A-F).

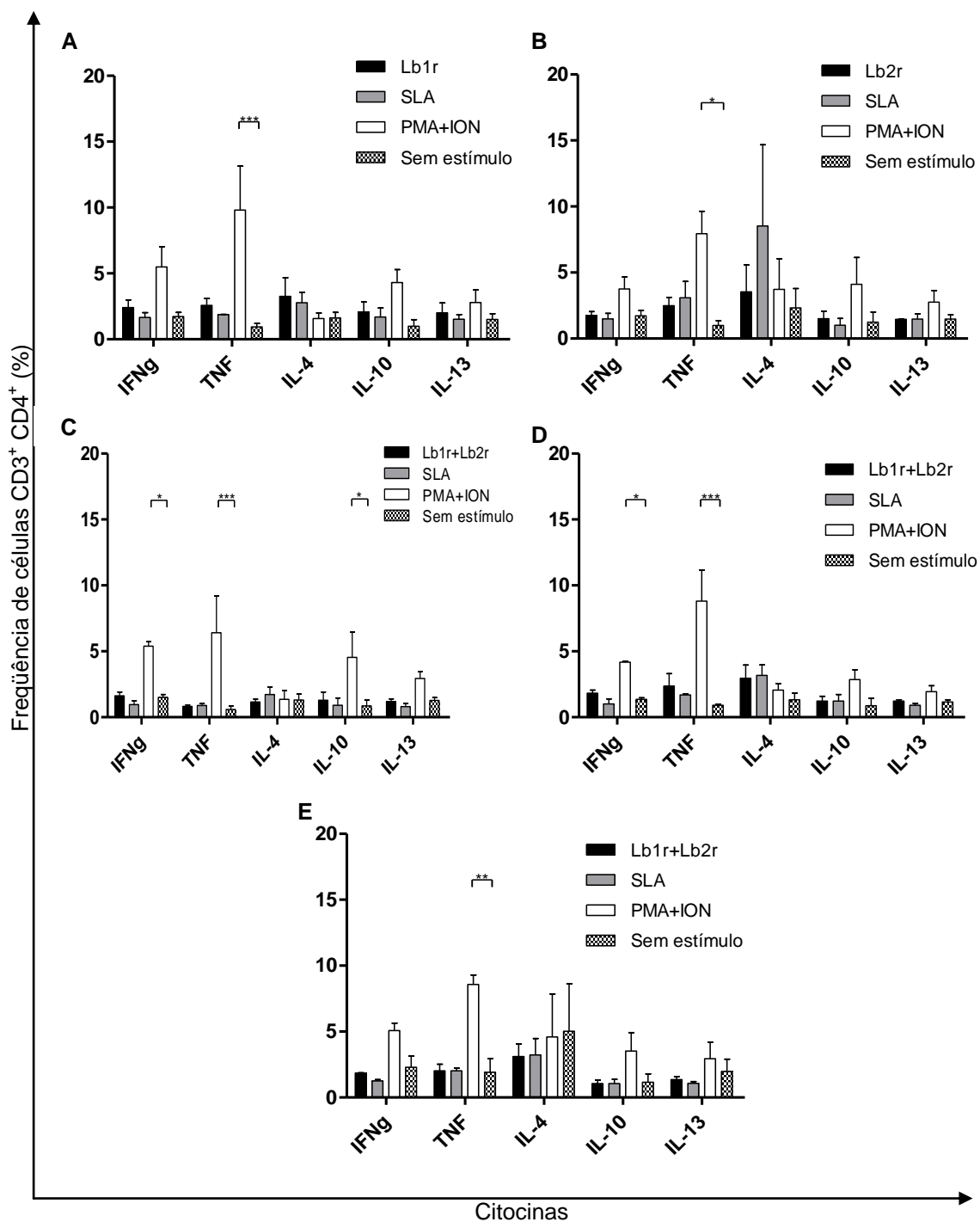


Figura 4.16: Representação gráfica das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). (A) Frequência dos linfócitos T CD4⁺ e citocinas produzidas nas células dos animais do grupo G1, com estímulo antígeno-específico por Lb1r; (B) grupo G2, com estímulo antígeno-específico por Lb2r; (C) grupo G3, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; (D) grupo G4, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; (E) e nas células dos animais do grupo G5, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r. Média + SEM são mostrados. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na frequência dos linfócitos T CD4⁺.**

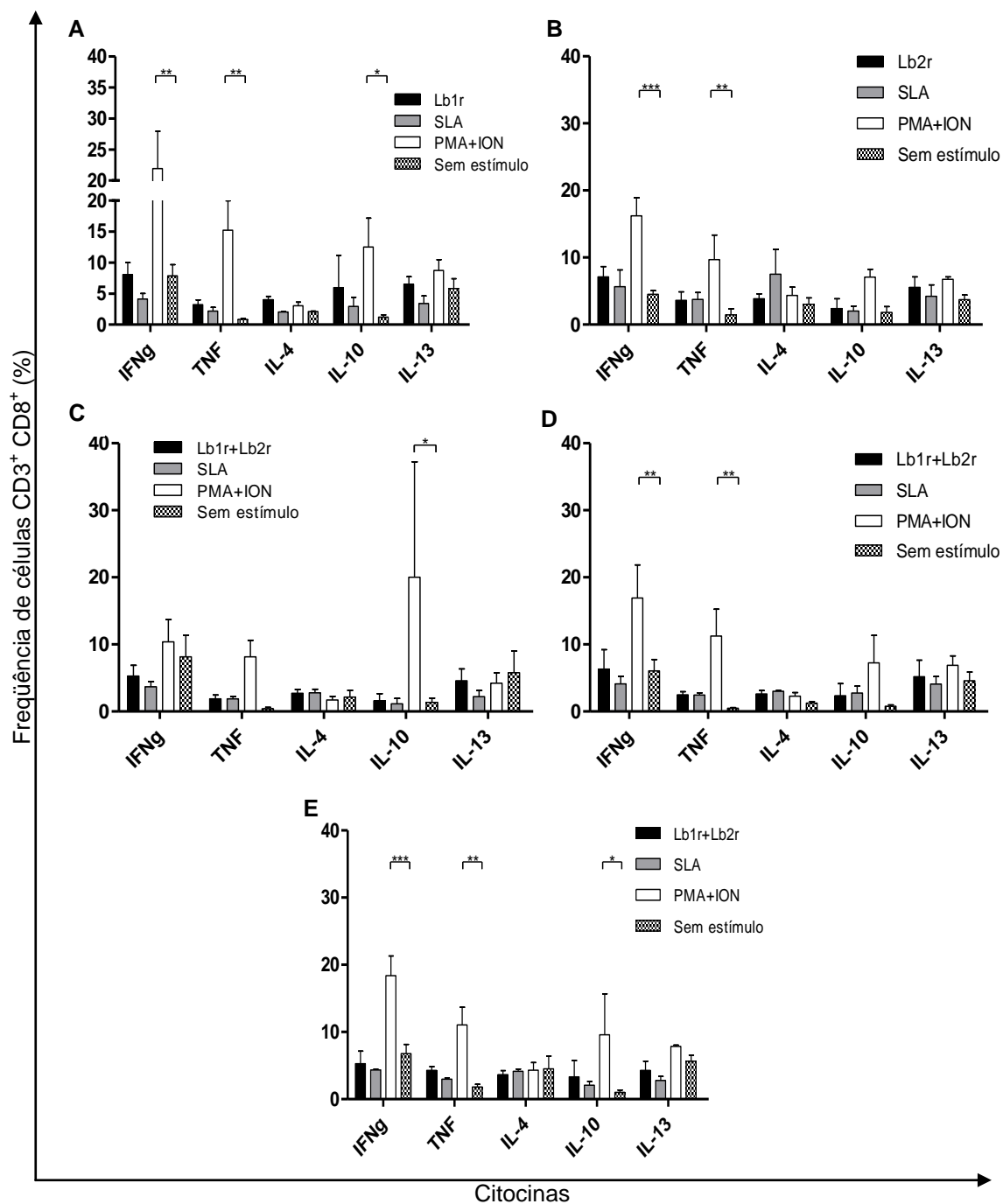


Figura 4.17: Representação gráfica das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD8⁺ do baço dos camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A)** Frequência dos linfócitos T CD8⁺ e citocinas produzidas nas células dos animais do grupo G1, com estímulo antígeno-específico por Lb1r; **(B)** grupo G2, com estímulo antígeno-específico por Lb2r; **(C)** grupo G3, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; **(D)** grupo G4, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r; **(E)** e nas células dos animais do grupo G5, com estímulo antígeno-específico por Lb1r+Lb2r. Média + SEM são mostrados. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na frequência dos linfócitos T CD8⁺.

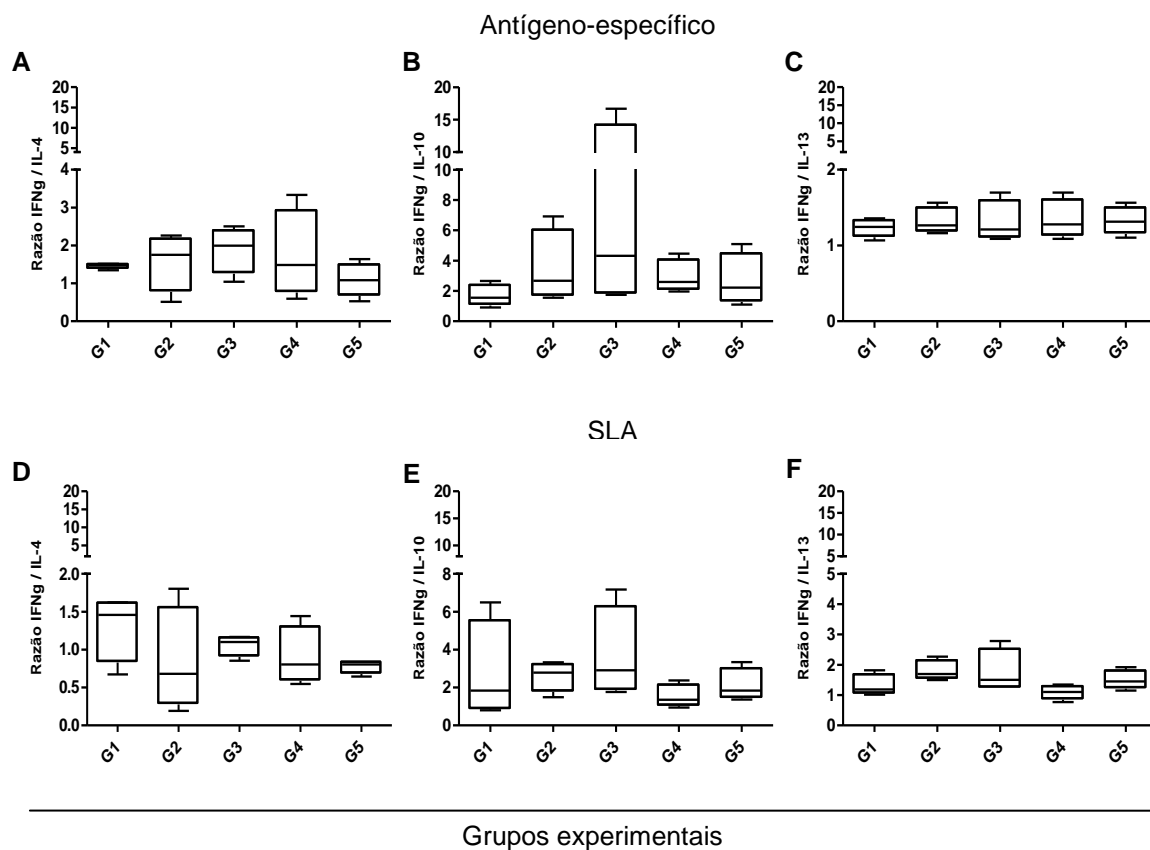


Figura 4.18: Razão entre a porcentagem de linfócitos T IFN- γ^+ e as citocinas IL-4 $^+$, IL-10 $^+$ e IL-13 $^+$, do baço dos camundongos BALB/c após o desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). **(A-C)** Frequência dos linfócitos T estimulados com antígeno-específico; **(D-F)** e estimulados com SLA. A barra representa valores mínimos e máximos.

A análise comparativa entre os grupos antes e após o desafio com *L. (V.) braziliensis*, exibiu um aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4 $^+$ produtores de IFN- γ no grupo G1 ($p < 0.01$), após a inoculação dos parasitos (Figura 4.19). Nos demais grupos não houve diferença estatística na frequência dessas células após o desafio dos animais. Assim como a frequência de linfócitos T CD4 $^+$ produtores de TNF, IL-4, IL-10 e IL-13 e de linfócitos T CD8 $^+$ produtores IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13 se mantiveram estatisticamente similares (dados não mostrados).

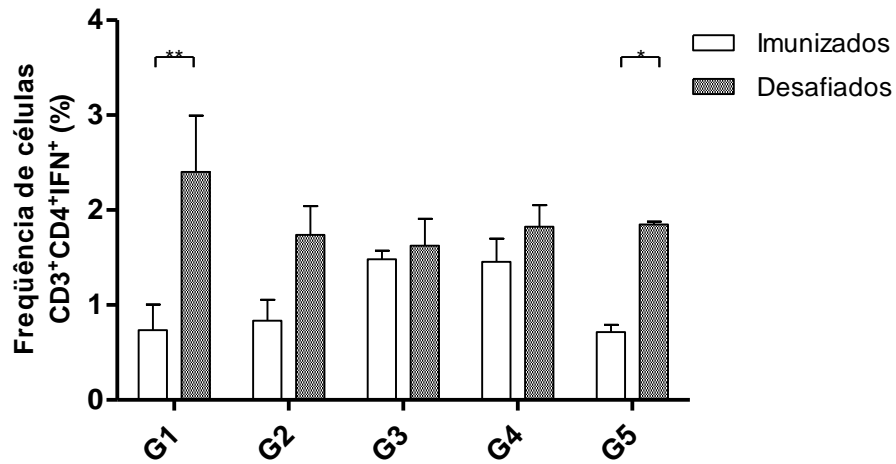


Figura 4.19: Representação gráfica da frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ do baço dos camundongos BALB/c antes e após o desafio com *L. (V.) braziliensis*. Foram utilizados 5 animais de cada grupo (G1= Lb1r + CpG; G2= Lb2r + CpG; G3= Lb1 + Lb2 + CpG; G4 = CpG; G5= PBS). Média \pm SEM são mostrados. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; aumento significativo na frequência dos linfócitos T CD4⁺ IFN⁺.

5 DISCUSSÃO

A vacinação é considerada uma forma de controle de doenças com efetiva redução da mortalidade e da morbidade (Kedzierski, 2011; Mutiso *et al.*, 2013). A informação a respeito dos antígenos imunogênicos de *Leishmania* é importante devido à complexidade do parasita e a identificação de antígenos patogênicos permite o melhor entendimento do processo patológico e a criação de estratégias para torná-los não-patogênicos (*The Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines*, 2011). A pesquisa para o desenvolvimento de vacinas para as diferentes formas de leishmaniose compreende diversos antígenos utilizados em diferentes modelos experimentais (Coler & Reed, 2005; *The Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines*, 2011). Formulações vacinais poliproteicas como a Leish-111f, são promissoras por terem a capacidade de conferir um alto grau de proteção em modelos animais experimentais da doença.

Com base em estudos anteriores do nosso grupo e nos estudos para o desenvolvimento de vacinas de segunda geração, nesta dissertação foram expressas duas proteínas recombinantes (Lb1r e Lb2r) de *L. (V.) braziliensis* e posteriormente avaliadas em separado e em conjunto, quanto ao seu potencial imunomodulador e sua capacidade de induzir proteção contra a leishmaniose cutânea, quando associadas a um adjuvante.

Os genes das duas proteínas selecionadas foram clonados a partir do DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* e a expressão das proteínas recombinantes foi realizada em um sistema heterólogo utilizando bactérias *E. coli*, transformadas com plasmídeos do tipo pET. Em vetores do tipo pET, a expressão do gene de interesse é controlada pela atividade da RNA polimerase do bacteriófago T7, o qual é codificado cromossomalmente na bactéria modificada e está sob o controle do operador *lac*. Dessa maneira, a expressão dos genes de interesse é controlada pela adição de IPTG, um agente indutor da expressão do promotor *lac* (Jonasson *et al.*, 2002).

Clones bacterianos positivos para os insertos de interesse foram crescidos em cultura e submetidos à indução com IPTG para identificar os clones capazes de expressar as proteínas recombinantes. As induções foram realizadas por um período de 3 horas, com a obtenção das proteínas ao final desse período. Kumar e colaboradores (2004) observaram que o acúmulo de proteína recombinante ocorre

após 2 horas de indução e permanece constante até 4 horas. Porém, após 3 horas a cultura atinge o ponto de saturação, favorecendo o tempo de 3 horas como o período de escolha para a indução.

Quanto à solubilidade, a proteína recombinante Lb1r se apresentou altamente solúvel, ao passo que a proteína heteróloga Lb2r se apresentou significativamente insolúvel. Contudo, optou-se por trabalhar com a fração solúvel desta última visto às vantagens que esta fração oferece em termos de purificação da proteína.

Muitas proteínas recombinantes eucarióticas expressas em *E. coli* são obtidas de maneira insolúvel e perdem modificações pós-traducionais essenciais (Quartley *et al.*, 2009; Khow & Suntrarachun, 2012). Durante a expressão em sistemas heterólogos as proteínas recombinantes podem se apresentar inativas, agregadas em corpos de inclusão (Rudolph & Lilie, 1996; Villaverde & Carrio, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004). A agregação de proteínas recombinantes superexpressas em bactérias pode ser resultado do acúmulo de altas concentrações ou do processamento ineficiente por chaperonas moleculares (Sorensen & Mortensen, 2005). No ambiente sobrecarregado do citosol as interações intermoleculares são favorecidas, com geração de proteínas inativas pela associação de polipeptídeos não-enovelados com moléculas tais como DNA e RNA (Young *et al.*, 2004). Diversos métodos de redirecionamento de proteínas de corpos de inclusão para frações solúveis são descritos na literatura (Pérez-Pertejo *et al.*, 2003; Quartley *et al.*, 2009; Khow & Suntrarachun, 2012). Porém o rendimento pobre atingido nesses métodos, a possibilidade do procedimento afetar a integridade da proteína, o baixo custo e relativamente menor consumo de tempo da purificação das proteínas solúveis em relação à insolúvel, incentivam a preferência pela utilização das frações solúveis (Sorensen & Mortensen, 2005).

A utilização de vetores contendo sequências para a síntese de uma cauda de poli-histidina permitiu a purificação de Lb1r e de Lb2r por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺, em alto grau de pureza. Conforme Li (2010), uma das vantagens da utilização da cauda de histidinas para a purificação de proteínas heterólogas é que seu pequeno tamanho não interfere na estrutura ou atividade da proteína alvo. As proteínas Lb1r e Lb2r também foram submetidas a remoção do LPS de maneira a prevenir a ocorrência de efeitos adversos e possível influência na resposta imunológica. A remoção da endotoxina proveniente do sistema de expressão empregado na produção das proteínas recombinantes é de extrema importância,

uma vez que essa molécula é altamente tóxica *in vivo* e *in vitro*, podendo causar efeitos adversos, como injúria tecidual e até mesmo a morte (Magalhães *et al.*, 2007; Serdakowski London *et al.*, 2012).

Uma potente resposta humoral foi induzida pela imunização dos camundogos BALB/c, o que reflete a imunogenicidade dos antígenos recombinantes e seu potencial em promover resposta imunológica tanto do tipo Th1 quanto Th2, uma vez que a subclasse de imunoglobulinas IgG2a está relacionada a uma resposta celular Th1 e IgG1 a um resposta do tipo Th2 em camundongos (Coffman, 1993; Liew, 2002). Na literatura, antígenos de *L. major* associados a adjuvantes que promoveram um aumento dos níveis de IgG2a após as imunizações foram eficazes na proteção de camundongos BALB/c contra a infecção por *L. major* (Badiee *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2013; Bayih *et al.*, 2014). Assim sendo, a capacidade de promoção de uma resposta imunológica inicial predominantemente do tipo Th1 pode estar relacionada com o potencial protetor da formulação vacinal.

Os anticorpos produzidos pelos animais do grupo que recebeu somente a formulação com a proteína Lb1r apresentaram pouca ou nenhuma reatividade cruzada com o antígeno Lb2r, enquanto os anticorpos anti-Lb2r reconheceram Lb1r. Esse resultado ressalta a importância da utilização de formulações vacinais poliproteicas para a obtenção de uma proteção eficiente contra a infecção por micro-organismos complexos como *Leishmania*. De forma curiosa mas relevante, os grupos vacinais (G1, G2 e G3) tiveram títulos elevados de IgG2a contra SLA. Porém, pós-desafio, parece ter favorecido uma resposta imune principalmente Th2, sugerido pelos níveis aumentados de IgG1 contra SLA. A administração da proteína Lb2r associada ao CpG ODN promoveu o aumento dos níveis tanto de IgG1 quanto IgG2a após a imunização. Entretanto, o grupo 3, aquele que recebeu os dois antígenos mais CpG ODN teve um ligeiro aumento de IgG2a contra o antígeno Lb2r. Este grupo foi aquele que consistentemente apresentou as menores lesões. Mais estudos são necessários para caracterizar a imunogenicidade desse antígeno uma vez que, embora os anticorpos não desempenhem um papel ativo na eliminação da infecção, algumas características podem ser de interesse para uma vacina terapêutica. Na leishmaniose tegumentar provocada por *L. (V.) braziliensis*, o IFN- γ e TNF- α são as principais citocinas envolvidas no dano tecidual, enquanto a IL-10 atua na modulação da resposta Th1 (Bacellar *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2014). Na fase tardia da doença, a IL-10 pode ser importante na limitação do dano provocado no

tecido (Faria *et al.*, 2005; Bonfim *et al.*, 2007). De acordo com a abordagem vacinal empregada, a produção de IL-10 influencia diferencialmente nessa modulação da resposta Th1 (Darrah *et al.*, 2010). A capacidade dos anticorpos IgG de induzir a produção de IL-10 por macrófagos (Miles *et al.*, 2005), pode contribuir para a modulação de uma resposta imune Th1 exacerbada, quando a infecção já está estabelecida.

A frequência das populações de linfócitos tanto T CD4⁺ quanto CD8⁺ não sofreu alterações antes ou após o desafio dos camundongos BALB/c. A razão de linfócitos IFN- γ ⁺ / IL-10⁺ foi significativamente maior no grupo 3 que recebeu Lb1r + Lb2r + CpG ODN após a imunização. Porém, quando analisadas as frequências das populações CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas, não houve diferença significativa na produção dessas duas citocinas nem das demais analisadas entre os grupos. Não foi observada uma resposta imune protetora, expressa por uma redução significativa no tamanho ou na gravidade das lesões, em todos os animais imunizados comparados aos grupos de controle. Este achado foi compatível com os resultados da citometria que não evidenciaram um perfil preferencialmente definido de resposta imune celular efetora. Em diversos trabalhos nos quais os animais foram protegidos contra a doença cutânea, o efeito protetor foi associado a uma resposta celular predominantemente do tipo Th1 e de células CD8⁺, com produção de IFN- γ e IgG2a e pouca IL-4 e IL-10 (Aebischer *et al.*, 2000; Coler *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2002; Bertholet *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2013). Embora não seja estatisticamente significativo, foi observada uma redução no tamanho e gravidade das lesões apresentada pelo grupo de camundongos BALB/c que recebeu os dois antígenos recombinantes associados ao CpG ODN, sugerindo que a manipulação da formulação vacinal (adjuvação), das vias de administração e/ou da estratégia de administração poderá contribuir para a obtenção de uma vacina mais eficaz contra a infecção por *L. (V.) braziliensis*

No estudo realizado por Moura e colaboradores (2005) para o desenvolvimento deste modelo de infecção com *L. (V.) braziliensis*, foi verificado que a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas é reduzida na oitava semana pós-infecção. Uma vez que a infecção é auto-resolutiva no modelo BALB/c, o fato de não termos encontrado diferenças na frequência de linfócitos T produtores de citocinas entre os grupos vacinados e o grupo controle negativo pode estar relacionado com o período escolhido para a coleta do material para análise, visto

que a mesma foi realizada no momento em que as lesões já apresentavam sinais de resolução. Contudo, os animais que receberam a formulação com as duas proteínas apresentaram lesões menores e de menor gravidade em relação aos animais dos demais grupos, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

No trabalho de Jayakumar e colaboradores (2011), os camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) panamensis*, outra espécie do subgênero *L. (Viannia)* que também pode provocar a forma mucosa da doença, exibiram lesões menores e níveis de carga parasitária reduzida quando foram submetidos à esquema de vacinação heterólogo *prime-boost*. A formulação vacinal dos animais que apresentaram proteção contra a infecção consistia de uma dose inicial contendo uma sequência de DNA que codifica para uma proteína antigênica juntamente com um adjuvante sintético e uma dose de reforço utilizando um vetor viral expressando a sequência de DNA do antígeno de *Leishmania*. Quando somente o vetor viral foi utilizado como adjuvante, os animais não apresentaram proteção contra a infecção. Cada vez mais, diferentes adjuvantes associados e estratégias de *prime-boost* heterólogo estão sendo empregados como esforços para desenvolvimento de vacinas contra protozoários e doenças cuja resposta imune celular tem um papel de destaque (Chinchilla *et al.*, 2007; Arama *et al.*, 2012; Das & Ali, 2014; Knudsen *et al.*, 2015). Uma vez que os antígenos que utilizamos nas imunizações se mostraram imunogênicos através da produção de imunoglobulinas, uma das hipóteses para não termos observado proteção tanto nos camundongos quanto nos hamsters, é de que o esquema de imunização escolhido, tanto no que diz respeito à adjuvação quanto à via de administração, não induziu uma amplificação da resposta imune celular específica que pudesse auxiliar no controle da doença, sugerindo que alterações na estratégia de vacinação podem auxiliar na obtenção de um resultado positivo no nosso estudo.

O adjuvante CpG ODN quando administrado isoladamente, proporcionou uma redução na severidade da infecção por *L. major* em macacos rhesus, porém esse efeito não foi diretamente correlacionado à frequência de células do sangue periférico secretoras de IFN- γ (Flynn *et al.* 2005). Ao associar esse adjuvante a proteínas nativas (Iborra *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2010; Shargh *et al.*, 2012) ou proteínas recombinantes (Rhee *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2014), uma resposta imune protetora também foi obtida em modelos murinos contra a infecção por *L. major*. Embora a associação do CpG ODN com proteínas ribossomais

recombinantes de *L. major* tenha resultado numa formulação vacinal eficiente na proteção de camundongos BALB/c contra uma infecção realizada utilizando promastigotas misturados a extrato de glândula salivar de flebotomíneos (Ramirez *et al.*, 2013), em outro estudo a combinação de antígenos recombinantes de *L. (V.) braziliensis* com hidróxido de alumínio, em estratégia *prime-boost* de administração, a formulação não conferiu proteção (Salay *et al.*, 2007). Portanto, os antígenos utilizados na formulação vacinal parecem influenciar a modulação da resposta imunológica pelos adjuvantes, atuando de maneira sinérgica ou não. Outro ponto importante que não podemos deixar de citar é o modelo de escolha para infecção desafio. Diferentes espécies de *Leishmania* apresentam patogenicidade, virulência e elicitam mecanismos imunopatológicos distintos.

A escolha do modelo hamster para ensaios de proteção foi devida a alta susceptibilidade desse animal à infecção por espécies de *Leishmania* dermatrópicas, incluindo às pertencentes ao subgênero *L. Viannia*, com lesões que são similares às lesões provocadas em humanos (Osorio *et al.*, 2003; Gamboa *et al.*, 2008; Espitia *et al.*, 2010; Gomes-Silva *et al.*, 2013). Porém, a falta de reagentes específicos para estudo imunológico nesse gênero compromete a utilização desse modelo em ensaios para vacina (Espitia *et al.*, 2010; Lória-Cervera & Andrade-Narvaéz, 2014). Todos os hamsters utilizados nesse estudo, incluindo aqueles pertencentes ao grupo controle, apresentaram lesão severa na pata e visceralização dos parasitas, embora o inóculo utilizado (1×10^5 promastigotas) seja relativamente baixo. Conhecidamente, diferentes isolados ou espécies de *Leishmania* não permitem a predição do resultado da infecção. As espécies membros do subgênero *L. (Viannia)* apresentam diferentes perfis de virulência (Rey *et al.*, 1990; Gamboa *et al.*, 2008). A infecção com protozoários da espécie *L. (V.) panamensis*, outra espécie das Américas que pode provocar a leishmaniose mucosa (Figueroa *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2014), não promove a visceralização dos parasitas, mesmo com um inóculo alto (1×10^6 parasitas) (Gómez-Galindo & Delgado-Murcia, 2013). Além do mais, diferentes inóculos e diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* apresentam diferenças na infectividade *in vitro* e *in vivo*, com resultados que podem variar desde persistência da lesão no sítio de inóculo à metástase cutânea e disseminação sistêmica nesse modelo de experimentação animal (Sinagra *et al.*, 1997; Gamboa *et al.*, 2008; Gomes-Silva *et al.*, 2013; Ribeiro-Romão *et al.*, 2014). Da mesma maneira, o modelo murino de infecção por *Leishmania* apresenta variação na lesão e na arquitetura dos

órgãos viscerais quando infectados com diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* (Pereira *et al.*, 2009), assim como são encontradas distintas manifestações clínicas provocadas por essas espécies de *Leishmania*. Tais aspectos clínicos são fenótipos da doença que podem estar associados à heterogeneidade genética dos parasitos (Grimaldi & Tesh, 1993; Cupolillo *et al.*, 1997; Cupolillo *et al.*, 1998), onde populações naturais de uma mesma espécie como *L. (V.) braziliensis*, apresentam um polimorfismo que pode ser superior àquele observado em populações de diferentes espécies (Cupolillo *et al.*, 1994; Cupolillo *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2009). Tendo em conta esses diversos perfis de virulência das cepas, acredita-se que para o desenvolvimento de uma vacina contra *L. (V.) braziliensis* seja necessário a utilização de diferentes antígenos, abordagens e adjuvação para atingir a proteção dos modelos de experimentação animal e, posteriormente, uma formulação para uso em humanos. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo contribuem com dois antígenos imunogênicos e capazes de modular a resposta imune. Porém, diferentes formulações e estratégias de imunização precisam ser empregadas para que possamos atingir uma melhor eficácia com o uso destes antígenos.

6 CONCLUSÕES

- As proteínas recombinantes Lb1 e Lb2 foram eficientemente expressas em sistema heterólogo, apresentando pesos moleculares de 23 kDa e 19 kDa respectivamente, semelhantes às proteínas nativas.
- As proteínas recombinantes foram consideradas com alto grau de pureza uma vez que o *western blotting* exibiu ligações antígeno-anticorpo altamente específicas, inclusive contra SLA.
- Os antígenos recombinantes Lb1r e Lb2r foram considerados imunogênicos através da promoção da produção de altos níveis de anticorpos específicos, tanto do tipo IgG1 quanto do tipo IgG2a. Os grupos que receberam as formulações vacinais tiveram títulos mais elevados de IgG2a contra SLA, após a imunização. Pós-imunização, embora sem diferença estatística, todos os grupos apresentaram maiores títulos de IgG1.
- Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13, após a imunização ou após o desafio.
- O grupo que recebeu somente o antígeno Lb1r associado ao CpG ODN revelou um aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ após desafio, em comparação com o momento pós-imunização.
- A razão de linfócitos IFN- γ ⁺ / IL-10⁺ foi significativamente maior no grupo 3 que recebeu Lb1r + Lb2r + CpG ODN após a imunização.
- A utilização dos antígenos Lb1r e Lb2r associados de diferentes maneiras ao adjuvante CpG ODN não foi eficiente na promoção de proteção contra o desafio com *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c e em hamsters dourados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abi Abdallah DS, Denkers EY. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front Immunol.* 2012 Dec 14;3:382.
2. Aebischer T, Wolfram M, Patzer SI, Ilg T, Wiese M, Overath P. Subunit vaccination of mice against cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infect Immun.* 2000;68(3):1328-1336.
3. Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MAP, Miles MA. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Path* 115: 311–316.
4. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.* 2012;7(5):e35671.
5. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):552-7.
6. Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2012; Jun;24(3):310-5.
7. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 2008 Jan;105(1):1-9.
8. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol.* 2004 May; 136(2): 341–348.
9. Arama C, Assefaw-Redda Y, Rodriguez A, Fernández C, Corradin G, Kauffmann SH, *et al.* Heterologous prime-boost regimen adenovector 35-circumsporozoite protein vaccine/recombinant *Bacillus Calmette-Guérin*

expressing the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite induces enhanced long-term memory immunity in BALB/c mice. *Vaccine*. 2012; Jun 8;30(27):4040-5.

10. Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, *et al*. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007 Jun 15;195(12):1846-51.
11. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30:1269-81.
12. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, *et al*. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002; Dec;70(12):6734-40.
13. Badiie A, Jaafari MR and Khamesipour A. *Leishmania major*. Immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. *Exp Parasitol*. 2007 Feb;115(2):127-34.
14. Badiie A, Heravi Shargh V, Khamesipour A, Jaafari MR. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. *Vaccine*. 2013 Jan 21;31(5):735-49.
15. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106.
16. Bayih AG, Daifalla NS, Gedamu L. DNA-protein immunization using *Leishmania* peroxidase-1 induces a strong CD4+ T cell response and partially protects mice from cutaneous leishmaniasis: role of fusion murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor DNA adjuvant. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(12):e3391.

17. Bertholet S, Goto Y, Carter L, Bhatia A, Howard RF, Carter D, *et al.* Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*. 2009; Nov 23;27(50):7036-45.
18. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000 Feb;173:17-26.
19. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 May 29;2:69.
20. Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Netto M. Cellular Analysis of Cutaneous Leishmaniasis Lymphadenopathy: Insights into the Early Phases of Human Disease. *Am J Trop Med Hyg* November 2007 77(5):854-859.
21. Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, *et al.* Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic área for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health*. 2009; Oct;14(10):1278-86.
22. Camera PO, Junger J, Pires FESS, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, *et al.* Haematogenous dissemination of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:1112-7.
23. Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YAW, *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun*. 2001;69(6):4103-4108.
24. Carneiro MW, Santos DM, Fukutani KF, Clarencio J, Miranda JC, Brodskyn C, *et al.* Vaccination with *L. infantum chagasi* nucleosomal histones confers protection against New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS One* 2012; 7(12): e52296.

25. Carter D, Reed SG. Role of adjuvants in modeling the immune response. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; Sep;5(5):409-13.
26. Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012; 3: 301.
27. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*. 2009 Jun;70(6):383-90.
28. Chinchilla M, Pasetti MF, Medina-Moreno S, Wang JY, Gomez-Duarte OG, Stout R, *et al*. Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing PfCSP and a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):3769-79.
29. Coffman RL. Mechanisms of helper T-cell regulation of B-cell activity. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; Jun 21;681:25-8.
30. Coler RN, Skeiky YAW, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, *et al*. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania* major stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002;70(8):4215-4225.
31. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2005 May;21(5):244-9.
32. Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt, *et al*. Proteome analysis of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* by

- two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; Jul;154(1):6-21.
33. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; Mar;50(3):296-311.
 34. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997; Sep;91(6):617-26.
 35. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Sep-Oct;93(5):663-8.
 36. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000; Apr;16(4):142-4.
 37. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):3126-32.
 38. Daifalla NS, Bayih AG, Gedamu L. *Leishmania donovani* recombinant iron superoxide dismutase B1 protein in the presence of TLR based adjuvants induces partial protection of BALB/c mice against *Leishmania major* infection. *Exp Parasitol.* 2012; Jul;131(3):317-24.
 39. Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RW, Chen L, Roederer M, Seder RA. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J Exp Med.* 2010; Jul 5;207(7):1421-33.

40. Das A, Ali N. Combining cationic liposomal delivery with MPL-TDM for cysteine protease cocktail vaccination against *Leishmania donovani*: evidence for antigen synergy and protection. PLoS Negl Trop Dis. 2014; Aug 21;8(8):e3091.
41. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009;22(6):491-502.
42. Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clin dermatol. 1996;14:417-23.
43. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 2004;27:305-18.
44. Duthie SM, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. Vaccine. 2012 Jan 5;30(2):134-41.
45. Ejov M, Dagne D; World Health Organization. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2014 (http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/245330/Strategic-framework-for-leishmaniasis-control-in-the-WHO-European-Region-20142020.pdf?ua=1 acesso em 11 de Maio de 2015).
46. Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, *et al.* Duplex real-time transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster modelo of New World cutaneous leishmaniasis. BMC Immunol. 2010; Jun 22;11:31.
47. Ezra N, Ochoa MT, Craft N.J. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. Glob Infect Dis. 2010 Sep;2(3):248-57.
48. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, *et al.* Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the

exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005; 73(12):7853-7859.

49. Faria DR, Souza PEA, Durffies FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009 Aug;31(8):432-9.
50. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 930257.
51. Ferreira JH, Gentil LG, Dias SS, Fedeli CE, Katz S, Barbiéri CL. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune response in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 2008; Jan 30;26(5):677-85.
52. Flynn B, Wang V, Sacks DL, Seder RA, Verthelyi D. Prevention and treatment of cutaneous leishmaniasis in primates by using synthetic type D/A oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs. *Infect Immun.* 2005; 73(8):4948-4954.
53. França-Costa J, Wanderley JL, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, *et al.* Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS One.* 2012;7(5):e36595.
54. Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med* (1990) 113(12): 934-940
55. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):4319-27.

56. Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin JC. Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*. 2008; Mar;135(3):319-26.
57. Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*. 2013; May;140(6):771-9.
58. Gómez-Galindo AM, Delgado-Murcia LG. Body weight as a determinant of clinical evolution in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; Sep-Oct;55(5):357-61.
59. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):293-307.
60. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr;8(4):419-33.
61. Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(3):230-250.
62. Guerra JAdO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIdARC, Gama P, Moura A, *et al*. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5(3): e980.
63. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado NF, Conceição-Silva F, *et al*. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce

and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 21; 106(16): 6748–6753.

64. Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. Nat Med. 1998 Dec;4(12):1409-15.
65. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):229-243.
66. Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol. 2002 Aug;18(8):332-4.
67. Hansson M, Nygren PA, Ståhl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnol Appl Biochem. 2000; Oct;32 (Pt 2):95-107.
68. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999;354:1191-99.
69. Hoffman F, van den Heuvel J, Zidek N, Rinas U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. Enzyme Microb Technol. 2004; Mar;34(3-4):235-241.
70. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N (omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. J Exp Med. 2001 Mar 19;193(6):777-84.
71. Iborra S, Parody N, Abánades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, *et al.* Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. Microbes Infect. 2008; Aug-Sep;10(10-11):1133-41.
72. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2: 72.

73. Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T cell responses providing protection against *Leishmania (Viannia)*. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(6): e1204.
74. John B, Hunter CA. Neutrophil Soldiers or Trojan Horses? Science 2008 321 (5891): 917-918.
75. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem. 2002; Apr;35(Pt 2):91-105
76. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006;22(9):439-45.
77. Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. Curr Med Chem. 2009;16(5):599-614.
78. Kedzierski L. Leishmaniasis. Hum Vaccin. 2011 Nov;7(11):1204-14.
79. Khoo O, Suntrarachun S. Strategies for production of active eukaryotic proteins expression system. Asian Pac J Trop Biomed. 2012; Feb;2(2):159-62.
80. Knudsen ML, Ljungberg K, Tatoud R, Weber J, Esteban M, Liljeström P. Alphavirus replicon DNA expressing HIV antigens is an excellent prime for boosting with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 protein antigen. PLoS One. 2015; Feb 2;10(2):e0117042.
81. Kumar P, Kothari H, Singh N. Overexpression in *Escherichia coli* and purification of pteridine reductase (PTR1) from a clinical isolate of *Leishmania donovani*. Protein Expr Purif. 2004; Dec;38(2):228-36.

82. Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology*. 2014; Mar 14;3(3):e13.
83. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W. and Killick-Kendric R. (ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. I. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
84. Lawn SD, Whetham J, Chiodini PL, Kanagalingam J, Watson J, Behrens RH, *et al*. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. *Q J Med* 2004; 97:781–788.
85. Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010; Feb 15;55(2):73-83.
86. Liew FY. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):55-60.
87. Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014, Jan-Feb;56(1):1-11.
88. Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhães PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc trop Med hyg*. 2005 Jan;99(1):55-61.
89. Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TC, Pessoa A Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(3):388-404.
90. Marsden PD. Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ*. 1990 Sep 29; 301(6753): 656–657.

91. Maurer M, Dondji B, von Stebut E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*. 2009; Aug;198(3):137-46.
92. Mazumder S, Maji M, Das A, Ali N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One*. 2011;6(2): e14644
93. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*. 2014; Jan;107(1):7-14.
94. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 2004; 189 (6): 1018-1023.
95. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):747-54.
96. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2013.
97. Moreno J. Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2007 Mar;23(3):86-8.
98. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*. 2011 Mar;240(1):286-96.
99. Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, *et al*. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 2005; Sep; 73(9): 5827–5834.

100. Mutiso JM, Macharia JC, Kii MN, Ichagichu JM, Rikoi H and Gicheru MM. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. J Biomed Res. 2013; Mar; 27(2): 85–102.
101. Nagill R, Kaur S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. Int Immunopharmacol. 2011; Oct;11(10):1464-88.
102. Nascimento IP, Leite LC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Braz J Med Biol Res. 2012; Dec;45(12):1102-11.
103. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* infection. J Immunol 2009; 183:8088-8098.
104. Okwor I, Uzonna J. Vaccines and vaccination strategies against cutaneous leishmaniasis. Hum Vaccin. 2009; May;5(5):291-301.
105. Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJB, Costa FAC, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasites & Vectors* 2013, 6:189.
106. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. Cytokine. 2014; Apr;66(2):127-32.
107. Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. Parasite Immunol. 2003; Mar;25(3):139-48.
108. Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for

cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. Am J Trop Med Hyg. 2001; March 64(3):187-93.

109. Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, *et al.* Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. Vet Parasitol. 2009; Nov 12;165(3-4):231-40.
110. Pérez-Pertejo Y, Reguera RM, Villa H, García-Estrada C, Balaña-Fouce R, Pajares MA, *et al.* *Leishmania donovani* methionine adenosyltransferase. Role of cysteine residues in the recombinant enzyme. Eur J Biochem. 2003; Jan;270(1):28-35.
111. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. Int J Pharm. 2008; Dec 8;364(2):272-80.
112. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science. 2008; Aug 15;321(5891):970-4.
113. Prajeeth CK, Haerberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. Infect Immun. 2011 Jul;79(7):2699-708.
114. Quartley E, Alexandrov A, Mikucki M, Buckner FS, Hol WG, DeTitta GT, *et al.* Heterologous expression of *L. Major* proteins in *S. cerevisiae*: a test of solubility, purity, and gene coding. Struct Funct Genomics. 2009; Sep;10(3):233-47.
115. Raman VS, Duthie MS, Fox CB, Matlashewski G, Reed SG. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. Front Immunol. 2012; Jun 11;3:144.

116. Ramírez L, Iborra S, Cortés J, Bonay P, Alonso C, Barral-Netto M, *et al.* BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:181690.
117. Ramírez L, Santos DM, Souza AP, Coelho EA, Barral A, Alonso C, *et al.* Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 2013; Feb 18;31(9):1312-9.
118. Ramírez L, Corvo L, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Santos DM, *et al.* Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania major* ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2014; Jan 2;7:3.
119. Reed SG, Coler RN, Campos-Neto A. Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. *Expert Rev Vaccines.* 2003; Apr;2(2):239-52.
120. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009; Jan;30(1):23-32.
121. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:581-96.
122. Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; Dec;43(6):623-31.
123. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu CY, Kirman JR, Turon TN, *et al.* Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein an CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med.* 2002; Jun 17;195(12):1565-73.

124. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* Response. PLoS Pathog 8(2): e1002536.
125. Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, *et al.* Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. Infect Immun. 2014; Dec;82(12):5203-13.
126. Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signalling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. Infect Immun. 2007 Aug;75(8):3823-32.
127. Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. Br Med Bull. 2006 Jul 17;75-76:115-30.
128. Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the new world. Virulence. 2011;2(6):547-52.
129. Rudolph R, Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J. 1996; Jan;10(1):49-56.
130. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science. 1984;223:1417-19.
131. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol. 2002 Nov;2(11):845-58.
132. Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, *et al.* Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse modelo of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous

- leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; Sep;14(9):1173-81.
133. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2010 Oct;26(10):466-9.
134. Schubach A, Haddad F, Paes-Oliveira M Neto, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr. *et al*. Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction in Scars of Treated Human Patients. *J Infect Dis*. (1998) 178 (3): 911-91.
135. Serdakowski London A, Kerins B, Tschantz WR, Einfeld J, Mackay K. Endotoxin removal and prevention for pre-clinical biologics production. *Biotechnol J*. 2012; Dec;7(12):1509-16.
136. Shargh VH, Jaafari MR, Khamesipour A, Jaafari I, Jalali SA, Abbasi A, *et al*. Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis. *Vaccine*. 2012; Jun 6;30(26):3957-64.
137. da Silva-Couto L, Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, da Silva Costa Souza BL, Moreira OC, Gomes-Silva A, *et al*. Intranasal vaccination with leishmanial antigens protects golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(1): e3439.
138. Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 Nov;102(11):1075-80.
139. Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; Jul;57(1):115-8.

140. Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3834-42.
141. Soong L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol*. 2012; Mar 21;3:58.
142. Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*. 2012; Nov;34(6):735-51.
143. Sorensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2005; Jan 4;4(1):1.
144. Sousa AQ, Parise ME, Pompeu MML, Coelho JM Filho, Vasconcelos IAB, Lima JWO, *et al*. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; Oct;53(4):380-5.
145. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011; Apr 12;29(17):3341-55.
146. Tacchini-Cottier F, Weinkopff T, Launois P. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. *Front Immunol*. 2012; Feb 27;3:32.
147. The Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines, Costa CHN, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC Jr, *et al*. Vaccines for the Leishmaniases: Proposals for a Research Agenda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(3): e943.
148. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*. 2011; Jul 15;51(2):337-51.

149. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J Immunol* 2004; 173:6521-6525.
150. Villaverde A, Carrió MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett.* 2003; Sep;25(17):1385-95.
151. Wack A, Rappuoli R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Curr Opin Immunol.* 2005; Aug;17(4):411-8.
152. Waegeman H, Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011; Dec;38(12):1891-910.
153. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases. Geneva: WHO Press; 2010.
154. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; Oct;5(10):781-91.