**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

BRUNO LUIZ SOARES CAMPOS

**Análise de imunogenicidade e proteção gerada
pelos imunógenos de terceira geração pVAX1-FSD e
pVAX1-SP contra a leishmaniose tegumentar
americana experimental**

São Paulo

2015

BRUNO LUIZ SOARES CAMPOS

**Análise de imunogenicidade e proteção gerada
pelos imunógenos de terceira geração pVAX1-FSD e
pVAX1-SP contra a leishmaniose tegumentar
americana experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Programa de
Fisiopatologia Experimental

Orientador: Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Bruno Luiz Soares

Análise de imunogenicidade e proteção gerada pelos imunógenos de terceira geração pVAX1-FSD e pVAX1-SP contra a leishmaniose tegumentar americana experimental / Bruno Luiz Soares Campos. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Luiz Felipe Domingues Passero.

Descritores: 1.Leishmaniose 2.Imunização 3.Imunidade celular 4.Anticorpos
5.Camundongos 6.Vacinas contra leishmaniose

Dedico este trabalho a Maria Tereza Soares, mulher de fibra que sempre me apoiou em tudo, sendo sempre minha fortaleza e ao meu avô Lazaro Soares (em memória), o qual foi fundamental na minha criação e amadurecimento.

Agradecimentos

Todo esse processo de pós graduação não é um caminho solitário, muita gente contribuiu com ele; queria dizer que desde as funcionárias da empresa Corline que mantinham o ambiente de trabalho limpo, até a alta cúpula de diretoria da faculdade de medicina têm minha gratidão, pois cada um foi importante à sua maneira.

Mas, para algumas pessoas, eu gostaria de deixar um registro formal de agradecimento.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe Maria Tereza, pelo apoio, confiança, incentivo, dedicação, ajuda e mais inúmeras coisas que ela fez e faz por mim. Se alcancei algo nessa vida, foi tudo graças a ela e sua força.

Gostaria de agradecer ao Dr. Luiz Felipe Domingues Passero, que foi mais que um orientador para mim, foi um irmão mais velho; por todo seu apoio intelectual, pelos seus conselhos sensatos, pela ajuda prática, pela descontração e por ter aparecido e aberto as portas para mim em um momento difícil da minha vida.

À Dra. Márcia Dalastra Laurenti, que me recebeu de braços abertos no grupo, sendo sempre muito atenciosa com qualquer problema burocrático/administrativo pelo qual passei durante essa jornada e pela ótima amizade que cultivamos.

Agradeço aos professores das disciplinas que cursei, também foram de grande importância na minha formação.

Aos funcionários do grupo LIM-50; Dra. Cláudia Gomes, que sempre me orientou com bons conselhos; Dra. Vânia da Matta, que sempre teve críticas positivas; ao Edson Tadeu, pela amizade, apoio e palavras de incentivo; à Thaise Tomokane, a qual é uma ótima pessoa de coração enorme que luta pelo funcionamento correto do laboratório e que transborda paixão em química.

Ao Prof. Dr. Esper Georges Kallas, por abrir seu laboratório onde foram realizados os estudos de citometria de fluxo; um obrigado à Dra. Suzan Pereira pela colaboração na produção, análise e interpretação dos dados do Citometro.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Corbett, pelo exemplo de pesquisador que é, e por me aceitar no grupo LIM-50.

Aos meus amigos de laboratório os quais eu dividi risadas, aflições, dúvidas, viagens e cervejas. Passei 3 anos muito bem acompanhado graças a eles, agradeço por terem me recebido tão bem e por terem preenchido o vazio, que era a saudade de casa, fico feliz por vocês terem sido companheiros até o fim. Muita gente passou por aquele laboratório, mas queria deixar um agradecimento especial para Fabio, Ana Carolina, Thais Bruna, Brenda, Ana Kelly, Fernanda Rodrigues, Fernanda Franceschini, Maria Fernanda, Mariana Belchor, Mariana Aschar e Joyce.

Gostaria de agradecer à amiga de laboratório Jéssica, por ter colaborado comigo quando eu começava a engatinhar com meus experimentos e por dividir tantas aflições.

À Thays Fragoso, que, além de ótima amiga e confidente, lutou comigo para que esses resultados saíssem; foram dias acordando muito cedo e saindo tarde, muitas horas de bancada lado a lado; por isso, gostaria de deixar um obrigado.

Ao Eduardo Yamamoto, pois, mesmo algumas vezes sem vínculo com meu projeto, propôs-se a acordar cedo e dividir horas de bancada, tendo nele um amigo que sei que posso contar, pois sempre interveio por mim em diversos momentos complicados e espero que ele saiba que a recíproca é verdadeira.

Ao meu amigo de longa data Lucas Simão, que, além de ótimo ouvinte e conselheiro, acolheu-me em São Paulo, dividindo seu próprio quarto, e permitindo, assim, que eu comesse a minha caminhada na Capital.

Ao Dr. Marcelo Sousa Silva, ótima pessoa que me acolheu no IHMT em Lisboa, ensinando-me técnicas e me apoiando no desenvolvimento de parte da minha pesquisa, permitindo assim que eu vivesse uma grande experiência internacional e crescesse muito como pessoa e pesquisador.

Um obrigado aos meus colegas do IHMT de Lisboa, por todo acolhimento, Jailson, Joana, Daniela, Claudia, Adriana e Sônia.

Ao pessoal da parte administrativa da Faculdade de medicina, Lia Negrão e Tânia.

À FAPESP (processo 2012/05219-8 e 2012/10409-0) , órgão que financiou meu projeto e minha estadia em São Paulo.

Ao Dr. Norival Junior, que, além de me ajudar com críticas construtivas, ainda me apresentou técnicas como SDS page e Western Blotting.

E, por fim, aos meus amigos de Santa Cruz do Rio Pardo que vêm de longa data e que, como eu, precisam viver seus compromissos, e, assim, não estão sempre presentes, mas que nunca me deixaram cair no esquecimento.

"O homem é assombrado pela vastidão da eternidade, então perguntamos a nós mesmos: irão nossos atos ecoar através dos séculos, estranhos ouvirão nossos nomes muito depois de termos partido e imaginarão quem fomos, o quanto lutamos bravamente o quanto amamos intensamente..." (Odisseu)

Resumo

SOARES, B.L.C. **Análise de imunogenicidade e proteção gerada pelos imunógenos de terceira geração pVAX1-FSD e pVAX1-SP contra a leishmaniose tegumentar americana experimental** Dissertação de mestrado apresentada à São Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 120p, 2015.

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, amplamente disseminada, sendo *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, no Brasil, as espécies de maior importância médico-epidemiológica. Devido ao impacto epidemiológico da leishmaniose, medidas profiláticas devem ser desenvolvidas para o controle da doença, tal como vacinas. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar a imunogenicidade e potencial protetor de dois imunógenos denominados como ferro superóxido dismutase (FSD) e serino peptidase (SP). Os genes codificadores dos antígenos foram sintetizados e clonados no plasmídeo pVAX1 (pVAX1-FSD e pVAX1-SP). Camundongos BALB/c foram imunizados com ambos os alvos na concentração de 1,0 µg/µL, por três vezes, a intervalos regulares de 15 dias, e desafiados ou não com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os animais foram avaliados clínica, parasitológica e imunologicamente nos estudos de imunogenicidade e proteção. Os resultados obtidos demonstraram que ambas os imunógenos foram pouco imunogênicos, não apresentando alterações em linfócito T CD4; por outro lado, detectaram-se frequências diminuídas de linfócito TCD8 produtores de IFN-γ e TNF-α. Entretanto, nos experimentos de desafio, verificou-se que os animais imunizados com pVAX1-FSD apresentaram uma resposta mista Th1 e Th2, devido ao aumento de linfócitos T produtores de IFN-γ e IL-4, o que se associou a níveis altos de IgG1 e IgG2a, levando a uma diminuição da carga parasitária. O alvo pVAX1-SP também induziu resposta imunológica mista nos animais, todavia foi detectado frequências elevadas de linfócitos T CD8 produtores IL-10, e esta resposta foi associada a ausência de proteção nesses animais.

Descritores: Leishmaniose, Imunização, Imunidade celular, Anticorpos, Camundongos, Vacinas contra leishmaniose.

Abstract

SOARES, B.L.C..Analysis of Immunogenicity and protection generated by third generation immunogens pVAX1-FSD and pVAX1-SP against experimental cutaneous leishmaniasis. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 120p, 2015.

American tegumentar leishmaniasis is an infectious disease, widespread, and in Brazil the species *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* are the most relevant in medical-epidemiological studies. Due to the epidemiological impact of leishmaniasis, prophylactic measures should be developed to control this disease, such as vaccines. Therefore, the present study aimed to evaluate the immunogenicity and the protective potential of two vaccine candidates known as iron superoxide dismutase (FSD) and serine peptidase (SP). FSD- and SP-coding genes were synthesized and cloned into plasmid pVAX1 (pVAX1-FSD and pVAX1-SP). BALB/c mice were immunized with both candidates at a concentration of 1.0 µg/µL, three times at intervals of 15 days and challenged or not with *L. (L.) amazonensis* promastigotes. Animals were evaluated clinically, immunologically and parasitologically in the studies of immunogenicity and protection. The results showed that both vaccines presented low immunogenicity, and after immunization BALB/c mice did not show significant changes in CD4 T lymphocytes, by the other side, the frequency of IFN-γ and TNF-α producing cells were low. However, after challenge pVAX1-FSD-immunized mice presented a mixed Th1 and Th2 immune response, due to the high frequencies of IFN-γ e IL-4-producing T lymphocytes, with association to high levels of IgG1 and IgG2a isotypes, leading to parasite burden decreasing. pVAX1-SP vaccine candidate also induced mixed immune response in animals, however high frequencies of IL-10-producing CD8 T lymphocytes was found, justifying the absence of protection in these animals.

Descriptors: Leishmaniasis, Immunization, Immunity cellular, Antibodies, Mice, Leishmaniasis vaccines

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Aspectos gerais	14
1.2. Epidemiologia.....	17
1.3. Imunopatologia das leishmanioses.....	19
1.4. Imunizações experimentais contra leishmaniose	26
1.5. Escolha dos imunógenos (alvos vacinais).....	35
1.6. Características biológicas dos imunógenos.....	36
1.6.1. Ferro Superóxido dismutase.....	36
1.6.2. Serino Peptidase	38
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. Materiais e Métodos	42
3.1. Parasitas	42
3.2. Produção dos imunógenos de DNA.....	42
3.2.1. IMUNÓGENOS FSD e SP	42
3.3. Produção de bactérias competentes	43
3.4. Transformação de bactérias competentes e produção dos Imunógenos de terceira geração.....	43
3.5. Preparação do antígeno total de <i>L. (L.) amazonensis</i>.....	45
3.6. Animais experimentais.....	45
3.7. Imunizações experimentais e desafio.....	46
3.8. ANÁLISES IMUNOLÓGICAS	47
3.8.1. FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T	47
3.9. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	50
3.10. Análise da resposta imune humoral	50
3.11. Tamanho de lesão e carga parasitária.....	51
3.12. Análise Estatística	52
4. Resultados.....	53
4.1. Análises de restrição dos plasmídeos pVAX1-FSD e pVAX1-SP	53
4.2. Análise dos potenciais imunogênicos dos imunógenos pVAX1-FSD e pVAX1-SP	55
4.2.1. Fenotipagem de linfócitos T.....	55
4.2.2. Avaliação da imunidade humoral	60

4.3. Análise dos potenciais protetores dos imunógenos pVAX1-FSD e pVAX1-SP...	62
4.3.1. Fenotipagem de linfócitos T.....	62
4.3.2. Quantificação de Citocinas	68
4.3.3. Imunidade humoral	69
4.3.4 Tamanho de lesão	70
4.3.5. Carga parasitária	72
5. Discussão.....	73
6. Conclusão.....	81
Referências	82
Anexos.....	93

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, família Tripanossomatidae e gênero *Leishmania*. Há aproximadamente 22 espécies patogênicas identificadas, sendo a maioria capaz de infectar diferentes hospedeiros vertebrados, como roedores, marsupiais, felinos, canídeos e humanos (HERRER e CHRISTENSEN, 1976; EL-ADHAMI, 1976; SILVEIRA et al., 1982; OLIVEIRA et al., 1993; PASSOS et al., 1996). Nas Américas, os registros sobre a leishmaniose tegumentar datam do século XVI, sendo que a origem pode ter sido na Amazônia ocidental na região andina, e, devido as migrações humanas, ela teria se espalhado pelo resto do território americano (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

A leishmaniose mucocutânea, uma forma grave de leishmaniose tegumentar, exemplifica muito bem esta teoria, pois se acredita que ela teve origem na Amazônia Andina, e que sua dispersão ocorreu devido ao ciclo da borracha, entre 1880 e 1912, somado a todo o processo de construção de rodovias (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). Também se acredita que a *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) infantum* tenha sido introduzida nas Américas com a colonização portuguesa e espanhola, pois os colonizadores ibéricos traziam seus cães, onde alguns eram infectados por esta espécie de parasita. Rapidamente, este protozoário se tornou capaz de infectar cães e raposas, os quais facilitaram sua disseminação, uma vez que são animais errantes (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

Assim, no presente, deparamo-nos com a problemática dessa doença no Brasil, onde a expansão urbana está diretamente associada à prevalência da doença, propiciando o aumento do número de casos, devido ao acesso e estabelecimento de trabalhadores em áreas de mata para execução de projetos de construção, desflorestamento, irrigações e agricultura (KEDZIERSKI et al., 2010; WHO, 2013).

Os protozoários causadores das leishmanioses são intracelulares obrigatórios (MODABBER, 2010; KEDZIERSKI, 2010) e constituem um grupo de

parasitas digenéticos, os quais possuem um ciclo de vida com duas formas evolutivas, as promastigotas (Figura 1A) e amastigotas (Figura 1B) (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

Figura 1: Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (A) e formas amastigotas em *imprint* de baço de hamster cronicamente infectado (B) com *L. (L.) chagasi*. As lâminas foram coradas com Giemsa e as imagens foram adquiridas no aumento de 1000X. Fonte: Figura A - Bruno Luiz Soares Campos; Figura B - Thaíse Yumie Tomokane.

Diferentes espécies de parasitas são capazes de infectar o homem e ocasionar diferentes formas clínicas da doença, no entanto, o parasita é transmitido de uma forma similar. Nesse sentido, a transmissão ocorre quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo e ingere sangue conjuntamente com células do hospedeiro (macrófagos e células dendríticas presentes na epiderme/derme) infectadas com formas amastigotas (PINHEIRO, 2004; KEDZIERSKI, 2010), que, posteriormente, diferencia-se em formas promastigotas e, ativamente, multiplicam-se no intestino do inseto vetor. Depois da multiplicação, esses parasitas se acoplam na parede do intestino do inseto até o desenvolvimento completo das formas promastigotas metacíclicas, que possuem maior locomoção, e, com isso, capacidade de migrar para a válvula estomodeal do inseto (SHADEN, 2006), assim, via aparelho bucal, ocorre a regurgitação (em meio a saliva) desses parasitas no organismo do hospedeiro mamíferos. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células apresentadoras de antígenos e, no interior das mesmas, diferenciam-se em amastigotas, reiniciando o ciclo biológico do parasita (SELVAPANDIYAN et al., 2014), representado na figura 2.

Figura 2: Representa o ciclo de vida do parasita no homem (setas azuis) e no inseto (setas vermelhas) e suas respectivas formas morfológicas, ilustrando a diferenciação em amastigotas em 3 e promastigotas em 7. Fonte: *Center for diseases Control and Prevention*.

Nas Américas, o principal vetor é um díptero, nematocerca, pertencente ao gênero *Lutzomyia* sp., com mais de 200 espécies identificadas, os quais podem ter hábitos domiciliares e pré-domiciliares com uma característica que dificulta combatê-los, pois seu ciclo de vida não requer água, mas sim matéria orgânica em decomposição (BASANO e CAMARGO, 2004).

1.2. Epidemiologia

A prevalência mundial da doença até 2012 foi de 300 mil casos de leishmaniose visceral com 20 mil mortes anuais; além disso, 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea foram reportados nos últimos 5 anos; ainda se estima que 310 milhões de pessoas estão em risco de contrair leishmaniose. Somada as deformidades ocasionadas pela leishmaniose cutânea, a forma visceral possui índices preocupantes de mortalidade, sendo que epidemias podem causar diversas mortes se não controladas, assim como em 1990, no Sudão, onde a taxa de mortalidade ocasionada pela leishmaniose visceral foi de aproximadamente 35% (WHO, 2013).

A doença é amplamente distribuída pelo mundo, é prevalente em 98 países nos cinco continentes (Figuras 3 e 4), sendo que o Brasil está entre os 10 países com maior incidência, tanto para leishmaniose cutânea quanto visceral. Mesmo com esses inúmeros casos registrados, estima-se que há grande quantidade de casos subnotificados, pois apenas 33 desses 98 países impõem a notificação obrigatória (WHO, 2013).

Podemos observar (Figura 3) que a Leishmaniose cutânea está muito bem distribuída pelo globo e as regiões tropicais contém maior prevalência da doença, sendo que o Brasil, em 2012, relatou mais de cinco mil novos casos.

Figura 3: Mapa mundial com a distribuição e frequência da leishmaniose cutânea. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012.

Em relação à leishmaniose visceral, o Brasil também está entre os líderes de prevalência, possuindo mais de mil novos casos em 2012, acompanhado pela Índia e o nordeste Africano (Figura 4).

Figura 4: Mapa mundial com a distribuição e frequência da leishmaniose visceral. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012.

Ressalta-se ainda que, no Brasil, as principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea, ou leishmaniose tegumentar americana, como também é denominada, são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* (SILVEIRA et al., 2009; SHAW et al., 1991). Além dessas, existem as espécies causadoras da leishmaniose visceral que são *L. donovani*, na África e Índia, e *L. infantum* (sinonímia *L. (L.) chagasi*), na Europa e América Latina (CHAPPUIS et al., 2007).

Das 11 espécies dermatrópicas que existem na América, 7 já foram identificadas no Brasil, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. No período de 1988 a 2007, a doença apresentou média anual de 27.736 casos autóctones, ressalta-se ainda que, no Brasil, já houve mais de 35 mil pessoas infectadas nos anos de 1994 e 1995. No ano de 2013, esse índice diminuiu pela metade, porém ainda é alto; nesse contexto, a região norte do Brasil contém a maioria dos casos registrados com números, somando mais de 40%, sendo o Pará o líder em casos registrados (PORTAL DA SAUDE, 2014).

Diante de números expressivos de casos, medidas profiláticas efetivas são necessárias, e, nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina se faz necessário.

1.3. Imunopatologia das leishmanioses

As manifestações clínicas podem ser de duas formas principais, a forma visceral, que, no Novo Mundo, é causada pela *L. (L.) chagasi*, e a forma tegumentar, que pode ser considerada uma doença polimórfica e espectral, variando de uma única lesão de pele a múltiplas espalhadas por todo o corpo (HANDMAN, 2001; PINHEIRO, 2004), e esta forma de doença pode ser causada por uma grande diversidade de espécies (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

Em relação ao quadro clínico, a leishmaniose visceral, ou calazar, pode afetar órgãos, como fígado, baço e medula óssea. Nesse caso, o paciente apresenta

hepatoesplenomegalia, associado a quadro de febre e caquexia, podendo ser fatal se não tratada corretamente (PINHEIRO, 2004). Já a leishmaniose tegumentar americana pode apresentar diferentes tipos de lesões identificadas, e é considerada espectral devido às respostas imunológicas opostas que algumas espécies podem induzir no hospedeiro vertebrado (DUNNING, 2009).

A resposta imune contra a leishmaniose ocorre em duas fases. A inicial compreende principalmente a ação da imunidade inata, mediada pelo sistema complemento e outros mediadores inflamatórios, assim como por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (BASANO e CAMARGO, 2004, PETERS e SACKS, 2006).

Quando o parasita é introduzido na derme, ocorre o processo de ativação do sistema complemento, podendo ser pela via clássica, das lectinas ou alternativa. Essa ativação pode levar a morte do parasita principalmente em parasitas com baixa virulência (LAURENTI et al 2004), interessante, o parasita infectivo consegue manipular o sistema imune do hospedeiro de forma favorável à sua sobrevivência. Logo após a invasão, as formas promastigotas se utilizam do sistema imune inato para sobreviver, para minimizar o ataque do sistema complemento, o parasita inativa a proteína C3b, por meio de uma glicoproteína de membrana, chamada gp63. Assim, uma vez que o C3b é inativado, o parasita invade, de maneira silenciosa, as células fagocitárias, conseguindo resistir a proteólise, e a degradação no fagossomo (SHARMA e SINGH, 2009).

Outro componente da resposta imune inata são os neutrófilos, que possuem papel dicotômico na infecção causada por *Leishmania*, podendo favorecer ou não a permanência do parasita. Caso ocorra esse perfil de resposta permissivo, o neutrófilo em contato com o parasita tem seu ciclo apoptótico atrasado, fazendo com que aquela célula infectada continue no sítio da lesão até a chegada dos macrófagos, que farão a fagocitose desses neutrófilos infectados, desta forma, o parasita invade silenciosamente os macrófagos, já que a fagocitose nessas condições não induz a explosão respiratória. Sendo assim, o parasita consegue utilizar também essa via do sistema imune inato a seu favor (SACKS e SHER, 2002).

No entanto, os neutrófilos têm suma importância e nem sempre esses serão permissivos à infecção, estudos demonstram que sua depleção em camundongos BALB/c no momento da infecção com *L.(V.) brasiliensis*, acarreta um

aumento da carga parasitária em comparação ao grupo controle, e mesmo *in vitro* a interação neutrófilo macrófago mediada por TNF- α se mostra de suma importância para eliminação de parasita (NOVAIS et al 2009).

Após esse primeiro contato com o sistema imune inato, ocorre a migração de células apresentadoras de antígenos, como, por exemplo, as células dendríticas, que, depois de fagocitarem o parasita ou antígenos dos mesmos, processam-nos e os carregam até os órgãos linfoides regionais, onde os apresentarão aos linfócitos via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I ou II para receptores de célula T (TCR) dos linfócitos. A subpopulação de linfócitos T que será ativada irá depender do MHC que o epítipo está sendo apresentado, é sabido que o MHCI geralmente apresenta epítopos derivados de proteínas endógenas e é responsável por ativar linfócitos TCD8; em contra partida, o MHCII é responsável por apresentar epítopos processados de proteínas exógenas e é diretamente ligado à ativação de linfócitos TCD4. Após correta interação entre os receptores de superfícies e antígeno, os linfócitos serão primados e montarão uma resposta específica contra determinado antígeno parasitário (ABBAS e LICHTMAN, 2006).

Assim, a resposta adaptativa, mediada pelos linfócitos, possui papel fundamental no curso da doença sendo esta um forte limitante de como será a progressão da doença.

A resposta imune celular de linfócitos T, de uma forma geral, é dividida em T *helper* 1 e T *helper* 2 e essas respostas dependem de alguns fatores como a espécie de *Leishmania*, fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro. É reconhecido que estas respostas são respostas antagonistas, onde a Th1, que é guiada pela produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α , tem um papel associado à eliminação do patógeno e com a resolução da doença; por outro lado, a resposta Th2 tem como principais citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 e está envolvida na indução da resposta imune humoral, em fenômenos de eosinofilia e, portanto, favorecem a progressão da doença (PINHEIRO, 2004; SHARMA e SINGH, 2009).

Em cepas de camundongos resistentes, a cura da doença foi associada à presença de IFN- γ liberados por linfócitos TCD4⁺ do tipo Th1 e pelo aumento da produção de NO nos macrófagos. Contraditoriamente, a persistência da lesão foi

relacionada à resposta Th2 e produção de IL-4 e IL-10, que suprimiram a ativação dos macrófagos (KEDZIERSKI, 2010).

Assim, as repostas Th1 e Th2 são importantes alvos de estudo, porém não são as únicas populações celulares que apresentam importância na resistência e susceptibilidade da leishmaniose. Nesse caso, os linfócitos T CD8 citotóxicos também desempenham um papel essencial na defesa do organismo contra parasitas intracelulares, e também possuem dois perfis de resposta que são polarizados, assim como os T *helpers*, por meio de citocinas, sendo subdivididos em T citotóxico 1 (Tc1) e T citotóxico 2 (Tc2). Nesse contexto, sabe-se que os linfócitos Tc1 são capazes de destruir células infectadas por meio de perforinas e mecanismos associados à expressão de FAS/CD95L, um iniciador do processo de apoptose via ativação da capase 8, e ainda são capazes de produzir IFN- γ e TNF- α , mostrando capacidade adicional de controlar a infecção por meio da produção de citocinas do perfil Th1. Em contrapartida, as células Tc2 destroem microorganismos intracelulares por via das perforinas e granzinas, e produzem IL-4, IL-5 e IL-10 (DOBRZANSKI et al., 2004).

Foi observado que, na leishmaniose experimental, o perfil Tc1 somado ao Th1 age em sinergia, criando uma imunidade protetora contra *L. major*, e que antígenos que induziam esses dois perfis, tendem a ser protetores (KRONENBERG et al., 2010). Porém, é sabido que o perfil de linfócitos T CD8 (Tc1) não é exclusivamente necessário para diminuir a carga parasitária, sendo que ação desses linfócitos é somente uma parcela do processo resolutivo, pois outras células podem atuar em caso de deficiência dos mesmos (HUBER et al. 1998).

Essa dicotomia da resposta imune é observada em trabalhos que vão desde modelos animais até humanos, e está exemplificada na figura 5 (PINHEIRO, 2004).

Figura 5: Esquema da dicotomia da resposta imune celular: tem-se o reconhecimento do protozoário ou de seus antígenos por células apresentadoras de antígeno, que, ao realizarem a apresentação para os linfócitos naïve, geram perfis diferentes de linfócitos conforme a citocinas presente durante o processo e apresentação, sendo IL-10 relacionada ao perfil Th2 e IL-12 com perfil Th1, conforme vemos nos dois perfis ilustrados na figura. Fonte: BARRAL e COSTA, 2012.

Após o reconhecimento do antígeno e indução de populações de linfócitos T, essas células primadas para um determinado antígeno podem gerar memória imunológica, sendo essa altamente eficaz para proteger o organismo de agentes patogênicos como a *Leishmania*. Se o organismo for capaz de montar uma resposta protetora, e gerar memória imunológica, em uma segunda exposição ao mesmo agente, a ativação da resposta imune específica será mais rápida e eficaz. Essa capacidade do sistema imune é fundamental para vacinação, para que possa existir uma proteção duradoura. Existem ainda debates sobre a necessidade da permanência da *Leishmania* viva no organismo para manutenção do *pool* de células de memória protetora, uma vez que alguns autores defendem que a cura estéril da doença acarreta na perda da memória protetiva. (HANDMAN 2001, BOGDAN 2008, FARBER, YUDANIN, RESFITO, 2014).

A partir desse contexto da importância da permanência parasitária, tem-se outro grupo de células com caráter relevante, que são os linfócitos T regulatórios,

os quais são associados com supressão da atividade leishmanicida dos linfócitos T CD4, favorecendo a permanência do parasita. Aparentemente, esta interação entre células infectadas, linfócitos efetores e células regulatórias permite a formação de uma imunidade duradoura e resistente contra reinfecções, pois a constante imunoestimulação gerada por antígenos parasitários pode levar a geração de memória imunológica e manutenção da proteção. No entanto, um desequilíbrio entre estas populações pode ocasionar a reativação da doença (BOGDAN 2008, PASSERO 2011).

As células de memória ainda são divididas em duas *subpopulações*: memória efetora, que são células que circulam nas periferias e fazem a imunovigilância do corpo contra algum patógeno específico, e as células de memória central, responsáveis por armazenar as informações biológicas e também por rápida expansão, localizando-se nos órgãos linfoides (MULLER et al., 2013; FARBER, YUDANIN, RESFITO, 2014).

Portanto, de acordo com o *background* imunológico do hospedeiro e as características inerentes a espécie do parasita, a LTA pode se encontrar em quadros clínicos atenuados ou exacerbados, podendo se dividir de maneira clássica em: leishmaniose cutânea ou localizada, mucocutânea, disseminada e anérgica difusa.

A leishmaniose cutânea localizada é a mais registrada, sendo caracterizada pela presença de lesão no sítio de entrada do parasita, principalmente membros inferiores, comumente causando linfadenopatia crural, esse processo inflamatório contribui para eliminação do parasita, porém ocasiona alto dano tecidual (GUIMARÃES et al., 2005). A leishmaniose mucocutânea está muitas vezes associada a um tratamento displicente da forma localizada, ocorrendo concomitantemente ou anos depois, sendo que essa evolução patológica ocorre em cerca de 3% dos casos, progredindo para intensa destruição tecidual da mucosa nasal, tornando-se, assim, uma doença grave. Clinicamente, a forma mucocutânea se caracteriza por coriza, obstrução nasal e, em casos mais avançados, presença de odor fétido. Acomete o nariz em cerca de 100% dos casos, as lesões atingem o septo cartilaginoso nasal e podem se estender para a parede lateral e assoalho bucal, região do palato, úvula e, em menor frequência, ocorre envolvimento da faringe, laringe, cordas vocais e lábio superior, com graus diversos de infiltração, granulação e ulceração; nas duas formas supracitadas, a resposta imune é

exacerbada e mediada por IFN- γ e TNF- α (GUIMARÃES et al., 2005, SILVEIRA et al, 2009).

Em 1986, foi descrita a forma da leishmaniose cutânea disseminada que apresenta lesões múltiplas em diversas partes do corpo, sendo essas papulosas acneiformes e raramente ulceradas, é uma forma clínica comumente associada à espécie *L.(V) braziliensis*, acometendo predominantemente homens que estão relacionados à atividade rural, os quais contraem a doença em alguma extremidade do corpo que posteriormente se alastra para outras partes (SILVEIRA, LAINSON e CORBETT, 2004, GUIMARÃES et al., 2005).

De maneira diferente da leishmaniose cutânea localizada e mucocutânea, que possuem forte resposta imune celular do tipo 1, com grande produção de IFN- γ e de TNF- α , somada a uma importante reação inflamatória com lesão tecidual, a leishmaniose cutânea anérgica difusa se distingue por uma baixa resposta linfoproliferativa e produção baixa ou ausente de IFN- γ . Dessa forma, por não apresentar uma resposta imunológica associada à resolução/controle da doença, os pacientes que desenvolvem essa forma adquirem múltiplas lesões nodulares pelo corpo acompanhadas por alto parasitismo, sendo que a principal espécie associada a tal forma é a *L (L) amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2005, SILVEIRA et al, 2009). Na doença experimental, este quadro clínico-patológico é similar, pois as lesões dos animais evoluem sem formação de úlcera, frequentemente disseminam e histologicamente se observa um infiltrado inflamatório composto basicamente por macrófagos parasitados, e os linfócitos são raros ou mesmo ausentes (CARVALHO et al 2012), evidenciando o grande comprometimento imunológico e tecidual do hospedeiro.

1.4. Imunizações experimentais contra leishmaniose

No contexto das leishmanioses, a vacinação seria a medida profilática de melhor custo-benefício, superando o combate ao vetor que geralmente requer maiores fundos e infraestrutura (PALATINIK-DE-SOUSA, 2008). As vacinas e imunógenos, de uma maneira geral, podem ser classificados de acordo com seus métodos de produção em: vacinas vivas ou leishmanização, vacinas de primeira, segunda e terceira geração.

O método mais antigo é a leishmanização, que consiste na inoculação de parasitas vivos e virulentos em indivíduos saudáveis, partindo do pressuposto de que após a cura da lesão primária existirá uma imunidade duradora contra reinfecção (KHAMESIPOUR et al 2006). Esta estratégia de vacinação foi muito usada no Irã, Israel, na extinta União Soviética na década de 70 e 80 e persiste até a atualidade no Uzbequistão. Embora seja uma interessante forma de imunização, devido à forte proteção e indução de imunidade duradoura (NADIM et al 1983), existe uma série de efeitos adversos já comprovados, como desenvolvimento de lesões persistentes com a presença de formas amastigotas viáveis no sítio da lesão (KHAMESIPOUR et al 2005), logo, estes indivíduos também podem ser considerados reservatórios da doença, com capacidade de transmiti-la. Por essa razão, para alguns estudiosos, esse método de imunização é antiético, pois se inocula parasitas vivos em humanos, e, portanto, induz-se uma doença ativa em indivíduos saudáveis, assim, essa prática foi abandonada em muitos países que têm buscado outros métodos (PINHEIRO, 2004; DUNNING, 2009).

A primeira geração de vacinas para leishmaniose constitui imunógenos produzidos com parasitas mortos, prática que começou a ser pesquisada por volta de 1940 (MODABBER, 2010; NASCIMENTO, 2009), sendo o Brasil pioneiro (OKWOR, UZONA; 2009). Essa estratégia de imunização parece não ser efetiva, pois indivíduos vacinados com estes imunógenos obtêm taxas de proteção que variam de 82% a ausência total de proteção (PINHEIRO, 2004; NASCIMENTO, 2009). Quando se compara o potencial protetor das vacinas de primeira geração para leishmaniose com as vacinas para a raiva, essa mesma categoria se mostra

com potencial protetor extremamente inferior. Até mesmo as vacinas vivas são mais efetivas, possivelmente pelo fato do parasita estimular de forma contínua e prolongada a imunidade do hospedeiro (KEDZIERSKI, 2011).

No Brasil, houve uma tentativa de produzir uma vacina de primeira geração polivalente, composta por cinco espécies de *Leishmania* mortas, mas, devido à dificuldade de padronização ou então de identificar o antígeno responsável pelas respostas encontradas, a Organização Mundial de Saúde (WHO) sugeriu, em reunião com representantes de vários países, que fosse usado somente uma espécie para produção da vacina. Em seguida, optou-se pela produção de vacinas de primeira geração composta apenas pelo extrato total de *L. (L.) amazonensis*, devido ao reconhecimento internacional de sua alta estimulação dos linfócitos e seu fácil crescimento *in vitro*, além de ter mostrado estimular uma imunidade protetora produzindo IFN- γ (MAYRINK et al., 2002).

Há também estudos que mostram a possibilidade de usar essa formulação vacinal, combinada com Bacillus Calmette-Guérin (BCG), como auxílio ao tratamento quimioterápico em humanos, na tentativa de reduzir efeitos tóxicos e dolorosos do tratamento com antimonial pentavalente, pois, de acordo com Mayrink et al. (2006), esta formulação favorece a redução do tempo de tratamento de indivíduos com leishmaniose cutânea.

Porém, especula-se que a inoculação do parasita morto pode não mimetizar a doença, assim, o hospedeiro processaria os antígenos do parasita de uma maneira peculiar, diferindo daquela gerada pelo patógeno viável. Outro ponto extremamente importante associado ao uso das vacinas de primeira geração é o fato de que nem todos os antígenos são protetores no modelo animal, contraditoriamente, alguns antígenos são supressores da resposta imunológica, facilitando o desenvolvimento de lesões. Portanto, este tipo de antígeno deve ser utilizado com muita cautela para evitar reações indesejadas ao hospedeiro (KEDZKAIZER, 2011).

Assim, purificando os imunógenos que modulam benéficamente a resposta Th1, pode-se alcançar resultados promissores; com essa ideia, as vacinas de segunda geração foram criadas. Esses tipos de vacinas são produzidos com proteínas purificadas e recombinantes, frações proteicas, parasitas modificados

geneticamente (cassetes suicidas), e bactérias carreando genes parasitários. Os cassetes suicidas são considerados importantes alvos para o desenvolvimento de vacinas devido ao seu curto ciclo de vida. Neste caso, produz-se parasitas mutantes pela inserção de certos genes que induzirão morte parasitária. Embora uma eficiente técnica na indução de proteção em modelos experimentais, esse tipo de imunógeno não foi testado em humanos (PASSERO, 2011; PALATINIK-DE-SOUSA, 2008).

Um dos primeiros trabalhos sobre vacinas experimentais de 2ª geração contra as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo data da década de 80 (TIMM et al 1980). Nesse trabalho, os autores purificaram frações antigênicas de membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis* e avaliaram sua imunogenicidade em camundongos Swiss. Esses experimentos demonstraram que os animais imunizados com estes antígenos apresentaram hipersensibilidade tardia quando o antígeno total desta espécie foi injetado subcutaneamente, sendo associado a uma alta taxa de linfoproliferação, contudo análises de proteção não foram realizadas.

A partir daquela década, uma ampla diversidade de estudos foi realizada utilizando antígenos de membrana na tentativa de inibir a entrada das promastigotas em células hospedeiras, através do reconhecimento destes fatores de membrana do parasita logo após a infecção, pois muitos deles são conservados entre as espécies (CHAMPSI; MCMAHON-PRATT, 1988, KEDZIERSKI et al, 2006). Nesse sentido, foi visto que a imunização com gliconjugados purificados, como o LPG, foi suficiente para gerar proteção completa e parcial em diferentes cepas de camundongos, como C3H/He e BALB/c (MITCHELL ET AL 1985; PINHEIRO et al 2007).

Outro antígeno pioneiro a ser estudado foi a enzima metaloproteinase de 63kDa (gp63), a qual tem sido alvo de estudos de imunização experimental e virulência, por ser uma proteína de membrana abundante e distribuída no gênero *Leishmania*, além de ser expressa principalmente nas formas promastigotas, (RUSSEL; ALEXANDER, 1988; OKWOR; UZONA, 2009). Seu potencial imunogênico foi avaliado em camundongos BALB/c e CBA/Ca imunizados com gp63 de *L. (L.) mexicana* purificada e encapsulada em lipossomos. Essa formulação apresentou alta taxa de proteção, associada à resposta benéfica de linfócitos T, pois sua transferência a camundongos saudáveis também induziu proteção após desafio (RUSSEL; ALEXANDER, 1988).

Entre as vacinas de segunda geração já liberadas para uso, encontra-se a Leishmune, que é utilizada na prática veterinária. Essa vacina é constituída por um enriquecido glicoproteico do Ligante Manose Fucose (FML) de *L. donovani* formulado com uma saponina, como adjuvante. Seus primeiros testes foram em camundongos e trouxeram uma proteção discreta de 68%, mas em cães esta vacina já passou pelos testes de fase II e III e hoje, é legalizada no Brasil, devido a ter demonstrado 92% de proteção e 76% de eficiência devido a resposta humoral induzida (PALATINIK-DE-SOUSA, 2008).

No entanto, com intuito de sanar alguns problemas referentes à purificação de proteínas, como o baixo rendimento e a conservação do material biológico, foi adotado o uso de proteínas recombinantes, que possuem modelos de poliproteínas ou quimeras, que podem ter ou não à adição de adjuvantes, além de haver a possibilidade de serem carregadas por bactérias para melhorar sua imunogenicidade (PALATINIK-DE-SOUSA, 2008).

Nas últimas décadas, novas estratégias de imunização experimental foram desenvolvidas. Nesse sentido, estudos têm focado nas vacinas de terceira geração ou também chamadas de vacinas gênicas. Nesse modelo, genes ou seus fragmentos são capazes de codificar antígenos potencialmente imunizantes, os quais são carregados por um DNA plasmidal, fagos ou cosmídeos (JUNIOR et al, 2004).

O conceito de vacina de DNA surgiu na década de 90 com a expressão de proteínas específicas em miócitos de camundongos, os quais foram transfectados através de imunização com plasmídeo contendo o gene alvo (WOLFF et al., 1990). Vacinas de ácido desoxirribonucleico funcionam a partir da incorporação do material genético (codificador de um determinado antígeno) introduzido no organismo com intuito de transfectar as células e produzir o antígeno proteico a partir da maquinaria celular do indivíduo vacinado (DONNELLY; WARHEN; LIU, 2012). Essa geração de vacina tem trazidos resultados promissores (KHAMESIPOUR et al, 2006), podendo ser alternativa de método de vacinação potencialmente capaz de gerar resposta imune. Sua produção começa com o isolamento dos genes a partir de técnicas de biologia molecular, esses frequentemente relacionados com a expressão de moléculas associadas à virulência. Tais genes então são clonados e inseridos em um carreador, comumente

um plasmídeo. Esses plasmídeos devem ter algumas propriedades como ser de origem de replicação bacteriana, o que permite uma eficiente replicação, podendo, com isso, serem replicados em centenas de cópias, e por possuir um gene de seleção confere às bactérias resistência a um antibiótico, permitindo, assim, a escolha correta dos clones que contêm o plasmídeo, um sítio múltiplo de clonagem que permite a clivagem por enzimas de restrição para inserção do gene de interesse que irá codificar o antígeno (JUNIOR et al, 2004).

Por fim, pode-se introduzir o plasmídeo em uma bactéria hospedeira, geralmente *Escherichia coli*, por um processo denominado transformação bacteriana que tem como finalidade gerar grandes quantidades de DNA para vacinação (JUNIOR et al, 2004).

Os métodos de administração alcançam uma gama de células e podem variar conforme o alvo de interesse da transfecção celular. O bombardeio da pele por micropartículas de ouro recobertas com plasmídeos leva à transfecção direta de queratinócitos epidérmicos e células de Langerhans que rapidamente migram para os linfonodos, com isso a fonte de apresentação de antígeno se torna ativa rapidamente, pois as células apresentadoras de antígeno (APCs) foram diretamente transfectadas. Por outro lado, o uso de injeções intramusculares do plasmídeo transfectam principalmente os miócitos e a apresentação antigênica pode ocorrer através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I (FIGURA 6) (DONNELLY; WARHEN; LIU, 2012).

Figura 6: Esquema das vias de transfecção, sendo: 1 - Transfecção direta nos miócitos. 2 - Transfecção a partir da apresentação e APCs. Fonte: Adpatada NATURE, KUTZLER e WEINER, 2008.

Embora não se saiba ao certo o modo de ação na indução de imunidade das vacinas de DNA, uma série de estudos vem indicando que o gene plasmídeo é capaz de entrar no núcleo das células locais transfectadas (como miócitos) e utilizar a maquinaria celular para produção do antígeno alvo, sem haver intercalação do vetor com o genoma do hospedeiro (LEDWITH et al, 2000; MANAM et al, 2000). Estes antígenos sintetizados pelo hospedeiro podem ser constantemente expressos através do (MHC) I dos miócitos, que basicamente irão estimular a resposta de linfócitos T citotóxicos, ou então via MHCII das APCs transfectadas. Nesse último caso, essas células, carreando tais antígenos, migram aos linfonodos de drenagem e apresentam tais antígenos aos linfócitos T e/ou B, podendo gerar respostas imune celular e humoral (Figura 7). E, de fato, resultados de fase I em humanos saudáveis imunizados com vacina de DNA contra HIV-1 tiveram aumentada sua resposta imune celular e humoral, além de memória duradoura, indicando que, além dos numerosos estudos em modelos experimentais, demonstrando imunogenicidade e eficácia, essas vacinas também podem ser efetivas para humanos (HARARI et al 2008; LI et al 2008).

Figura7: Esquema das maneiras que uma vacina de DNA pode estimular a resposta imune, mediada por MHCI ou MHCII. NATURE,KUTZLER e WEINER, 2008.

Portanto, as vacinas de DNA aparentam ser ótimas alternativas às outras gerações de vacina, pelo fato de que uma grande maioria dos trabalhos experimentais sobre leishmaniose esteja demonstrando que há uma ativação linfocitária principalmente das células T CD8, com indução de resposta imune celular

e proteção duradoura. Além disso, essas vacinas são relativamente fáceis de produzir, são altamente estáveis e o vetor pode ser reutilizado para confecção de outras vacinas de DNA (CAMPOS-NETO et al, 2002, SEDEGAH et al, 1994, RAMOS et al, 2009).

As vacinas de terceira geração contra leishmaniose exploram diversos parâmetros e modelos, sendo testadas em camundongos, hamsters e cães, podendo ser usadas em estratégias do tipo *prime-boosting*, na qual inicialmente imunizam-se camundongos com DNA plasmideal e em seguida com a proteína recombinante. Na maioria dos casos, os antígenos escolhidos para serem usados como vacinas de terceira geração são aqueles que possuem estudos prévios com enfoque de proteínas recombinantes (NAGILL, KAUR, 2011).

Exemplo disso é a gp63, que foi o primeiro alvo antigênico escolhido para ser usado como vacina de DNA, sendo que a imunização intramuscular com pCMV-gp63 desenvolveu uma forte resposta Th1 e conferiu significativa resistência contra *L. major* em camundongos (XU et al, 1995). Estudos posteriores também demonstraram que vacinas de DNA formuladas com o gene codificador da gp63 de *L. (L.) mexicana* protegeu parcialmente os camundongos do desafio homólogo, associado à indução de uma resposta Th1/Th2, marcadas pela presença de isótipos de IgG (DUMONTEIL et al, 2003).

Outros trabalhos avaliaram a vacina de terceira geração com o gene codificador da gp63, tentando criar estratégias para melhorar o desempenho do alvo vacinal que possuía uma proteção parcial (NAGILL, KAUR, 2011), também há estudos utilizando pCMV3ISS-gp63, demonstrando que a proteção gerada pelo alvo pode ser transitória, uma vez que os camundongos imunizados se mostraram inicialmente protegidos, porém, ao fim do período observacional, apresentaram lesões similares ao controle quando desafiados com *L. major* (AHMED et al., 2004).

Outro alvo de importância compreendido nas vacinas de DNA é o LACK (Receptor de Quinase C homólogo em *Leishmania*), o qual tem sido a vacina de DNA mais estudada para profilaxia da leishmaniose tegumentar e visceral. Resultados mostram que a imunização em camundongos com pECE-LACK pode trazer proteção duradoura contra *L. (L.) major*, associada ao aumento de IFN- γ . Essa vacina de DNA foi avaliada também contra *L. (L.) chagasi* através da via intranasal,

e, com esta estratégia de imunização, os animais experimentais tornaram-se protegidos do desafio, com a presença de uma resposta imunológica mista, mediada por IFN- γ e IL-4. Porém, quando a vacina de DNA foi administrada por via intramuscular, não protegeu os animais do desafio homólogo. Outro estudo corrobora o potencial indutor de uma resposta Th1, porém essa resposta não foi efetiva por não proteger contra infecção causada por *L. donovani* (NAGILL, KAUR, 2011).

Outros antígenos foram testados na forma de DNA, como NH36 (nucleosídeo hidrolase) que é o principal componente do FML. Esse gene foi inserido no plasmídeo VR1012 e usado para imunizar camundongos BALB/c conjuntamente com o adjuvante fosfato de alumínio. Após desafio com as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) donovani*, observou-se diminuição da carga parasitária do fígado em 91% e 65% respectivamente, sendo tais resultados associados ao aumento dos níveis de IFN- γ , somado a uma diminuição de IL-10 no modelo visceral (AGUILAR-BE et al, 2005; GAMBOA-LEON et al, 2006).

Houve também estudos que utilizaram combinações de antígenos em um único construto, como é o caso da vacina de DNA pcDNA3-LmsTI1 (proteína 1 induzível por estresse proveniente de *L. major*) mais o gene de TSA (antioxidante específico de tiol). Esse gene quimérico foi capaz de proteger parcialmente camundongos contra *L. major* (CAMPOS-NETO et al., 2002), associado ao estímulo de uma resposta imune celular mediada por IFN- γ . A proteção foi aumentada quando um coquetel de plasmídeo contendo os mesmos genes e o gene LACK foram testados, passando a ser total por estimular ambas as respostas benéficas de linfócitos T CD4 e CD8. No entanto essas formulações perdem a potência protetiva quando analisadas individualmente (MENDEZ et al., 2001).

Como já citado anteriormente, a resposta imune celular tem um papel fundamental, pois, se mediada com IFN- γ e TNF- α polariza a resposta para o tipo 1, tendo caráter resolutivo, geralmente se acompanha de uma diminuição de IL-4 e IL-10. Assim, devido ao fato de que os inúmeros antígenos apresentados como vacinas de DNA têm mostrado capacidade de estimular a resposta imune celular mediada por IFN- γ , como foi elencado nos trabalhos acima, justifica-se a escolha dessa abordagem vacinal para o presente trabalho.

1.5. Escolha dos imunógenos (alvos vacinais)

Com a publicação do secretoma de *L. donovani* (Silverman et al., 2008) foi possível ter um melhor entendimento dos fatores presentes neste conjunto de antígenos, uma vez que foram identificadas uma série de proteínas secretadas ou associadas à via de secreção de produtos de *L. donovani*. Esse rico banco de dados já publicados é extremamente importante para a escolha de antígenos vacinais. Assim, através do mesmo, foi analisado comparativamente se os antígenos secretados de *L. donovani* também estavam presentes em espécies do Novo Mundo, tal como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, através do banco de dados Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir dessas sequências, foram realizadas análises *in silico* para triagem de alguns antígenos.

Essas análises *in silico*, que também são conhecidas como vacinologia reversa, atualmente se mostram extremamente interessantes na triagem de novos candidatos vacinais através da predição de ligação do antígeno às moléculas de MHC. Essa técnica tem auxiliado na identificação de novos epítomos de células T que podem ser usados no desenho de vacinas contra doenças infecciosas e câncer (ROSA et al., 2010). Como exemplo, pode-se citar que somente em poucos anos, a vacinologia reversa aplicada a *Neisseria meningitidis* resultou na identificação de mais candidatos vacinais que aqueles descobertos durante quatro décadas de pesquisa por métodos convencionais (PIZZA et al., 2000; SERRUTO; RAPPUOLI 2006). Isso porque, com a sequência gênica ou de aminoácidos de um determinado antígeno, pode ser efetuada uma predição de sua capacidade de ligação ao MHC, e também a quais alelos de MHCI ou MHCII que ocorrerá a ligação. Isso é algo extremamente importante no desenho racional de vacinas, porque na espécie humana há diversos alelos codificadores das moléculas de MHCI e MHCII, portanto, antígenos capazes de se ligar na maioria deles terão uma maior possibilidade de induzir uma resposta imunológica na população como um todo (YANG; YU 2009).

Atualmente, existem várias bases de dados disponíveis para a análise e predição da ligação de antígenos a MHC. Há bases específicas para analisar se o antígeno se ligará a MHC de camundongos (BALB/c) e diversas para humanos

(TEPITOPE, ProPed, NetMHCII pan, MULTIPREP, SYFPEITHI, etc). Neste projeto, inicialmente verificamos quais das proteínas classicamente secretadas (Silverman et al., 2008) poderiam se ligar a todos os alelos de MHC de camundongos BALB/c, utilizando a base de dados “PredBALB” (<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>). Após essa triagem inicial, analisamos quais antígenos (já triados no PredBALB) poderiam se ligar aos alelos de MHC mais comuns da população humana, utilizando a base “SYFPEITHI” (<http://www.syfpeithi.de/>). Através desses dois bancos de dados em comunhão, fomos capazes de triar 67 possíveis antígenos capazes de se ligar a todos os alelos de MHC de camundongos e aos mais frequentes em humanos.

A partir dessa triagem, realizamos uma terceira triagem, a qual se baseou no tamanho dos fragmentos que serão amplificados. Escolhemos genes com um tamanho máximo de 1.200 pares de bases. A partir dessa estratégia, triamos dez candidatos, a partir dos dados obtidos, foram escolhidos dois alvos vacinais baseados em alguns trabalhos recentemente publicados na literatura científica, que são a ferro superóxido dismutase e a serino-peptidase.

1.6. Características biológicas dos imunógenos

1.6.1. Ferro Superóxido dismutase

O estudo das superóxidos dismutases começou na primeira metade do século passado, sendo, a primeira a ser estudada, a cobre superóxido dismutase, a qual foi isolada do sangue e do fígado de cavalos, e foram originalmente classificadas como hemocobrina e hepatocobrina, porém, 30 anos depois, foi descoberto seu potencial enzimático (BANNISTER; BANNISTER; ROTILO, 1987). As superóxido dismutases são encontradas em diferentes lugares da célula, sendo a magnésio superóxido dismutase encontrada na matriz celular, cobre e zinco encontradas no citosol de células eucarióticas e finalmente a ferro superóxido

dismutase que é secretada (MARÍN; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MORENO 2006).

A ferro superóxido dismutase (FSD) é uma enzima que utiliza o ferro como cofator, possui massa molecular de 23 kDa e se apresenta em forma dimérica; das variedades de superóxido dismutase, a ferro é a mais encontrada em protozoários e algumas espécies de bactérias (BANNISTER; BANNISTER; ROTILLO, 1987), chamando atenção como possível alvo de estudos imunogênicos, não somente pelos cruzamentos feitos *in silico*, mas pelo seu papel biológico importante no processo invasivo do parasita. É reconhecido que, quando uma forma promastigota de *Leishmania* sp. é fagocitada, um processo oxidativo é formado a partir da ativação dos macrófagos induzidos por IFN- γ ; uma vez ativados, ocorre a formação de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio que são capazes de eliminar o parasita durante a fagocitose, porém esse processo microbicida é interrompido justamente pela capacidade que a enzima ferro superóxido dismutase possui de transformar radicais oxidativos como O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Seguido a esse processamento, outras enzimas antioxidantes (triptanotona redutase, tripanoredoxina, peroxirredoxina, ascorbato peroxidase) neutralizam o peróxido de hidrogênio, que também é leishmanicida, auxiliando a neutralizar a respiração oxidativa da célula hospedeira (LONGONI; MARÍN; SANCHEZ-MORENO, 2014).

Devido a tamanha importância, essa enzima se encontra em diversos gêneros de parasitas *Plasmodium* sp., *Acanthamoeba castellani*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Perkinsus marinus*, *Trichomonas vaginalis*. Na família Tripanossomatidae, ainda existem diversas isoformas, sendo que *L. (L.) amazonensis* possui cinco, e interessante as isoformas secretadas são as mais importantes e mais virulentas (LONGONI; MARÍN; SANCHEZ-MORENO, 2014).

Trabalhos também demonstraram seu papel imunogênico. Daifalla e colaboradores (2011) demonstraram o potencial imunogênico e protetor da ferro superóxido dismutase recombinante contra *L. major*, que, com auxílio de adjuvantes (GLA-SE e CpG), apresentou capacidade de polarizar a resposta para o perfil Th1 em camundongos BALB/c os quais produziram mais IFN- γ comparado aos animais não imunizados, assim, os animais vacinados foram capazes de controlar a infecção parcialmente.

Seu potencial imunogênico também já foi comprovado como marcador molecular em alguns trabalhos para leishmaniose visceral canina e para leishmaniose cutânea e muco cutânea humana, mostrando-se específica e sensível para diagnosticar doentes através de ELISA, e tanto as frações de ferro superóxido dismutase referente as espécies de *Leishmania* quanto a referente de *Trypanosoma cruzi* foram capazes de validar o teste (LONGONI et al., 2011).

Ainda, recentemente, foi demonstrado que a ferro superóxido dismutase purificada de *L. (L.) peruviana* e *L. (L.) amazonensis* foi capaz de validar o diagnóstico de 51 soros de pacientes na Colômbia, sem obter reações cruzadas, mostrando que essas enzimas são sensíveis e específicas para detectar anticorpos anti-FSD de *Leishmania* sp. (LONGONI; MARÍN; SANCHEZ-MORENO, 2014).

1.6.2. Serino Peptidase

As peptidases são numerosas e representam 2% dos produtos de todos os genes, têm sido alvo de estudo por centenas de anos devido ao seu envolvimento com diversos processos fisiológicos, patológicos e tecnológicos, sendo, assim, alvos atrativos para o desenho de novas drogas (BARRET; RAWLINGS; O'BREIN, 2001).

Sabe-se que as peptidases desempenham papel crítico na sobrevivência do parasita, como reciclagem e metabolismo, invasão de células e tecidos do hospedeiro, nutrição do parasita e modificação das proteínas do hospedeiro, evasão do sistema e diferenciação do parasita (CAROSELLI et al., 2012, SILVA-ALMEIDA et al., 2012).

A função básica desta enzima que permite essas variadas funções biológicas consiste na capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, permitindo, assim, a quebra de proteínas, tal função, ligada ao papel biológico, aponta essa enzima como um fator de virulência (SILVA-ALMEIDA et al., 2012).

Tal enzima tem papel na patogenicidade da *Leishmania*, participando na evasão do sistema imune hospedeiro e em sua sobrevivência intracelular, pois esta é uma das responsáveis pela nutrição, reciclagem e metabolismo de proteínas e

modificação das proteínas do hospedeiro (CAROSELLI et al., 2012). Somado a isso, há trabalhos com *Trypanossoma cruzi* que mostram a participação de tal proteína na ativação das vias de sinalização das células do hospedeiro, onde, nesse modelo, a invasão intracelular depende da fusão e recrutamento com lisossoma no interior da célula invadida, assim, tal enzima tem função de engatilhar o aumento da concentração de Ca^{2+} , um fator importante para que ocorra fusão de membrana e a consequente entrada do parasita no lisossoma. Assim, esse estudo demonstra a importância dessa peptidase na infecção, sendo que parasitas sem esta proteína se tornam 75% menos infectivos para células HeLa, fibroblastos e mioblastos; tal resultado é obtido devido ao comprometimento da capacidade que o parasita tem de manipular, a partir da peptidase, a sinalização e o transporte de vesículas que são baseados no aumento do Ca^{2+} , de tal modo que, sem essa proteína, a manipulação de uma das principais vias de invasão fica comprometida (CALER, 1998).

Existem várias peptidases descritas no gênero *Leishmania*, estas são: aspartato, cisteína, metalo, treonina e serino peptidase. As serinos peptidases são encontradas no citosol e entre as subfamílias, as que são estudadas em relação à virulência parasitária são proliloligopeptidase e oligopeptidase B, sendo do clã SC e da família S9 (CAROSELLI et al., 2012). Abaixo, segue o esquema (Figura 8) das famílias conforme classificação de BASTOS e colaboradores (2013).

Figura 8: Fluxograma representando a disposição do Clã SC das serino peptidases. Fonte: Adaptado de BASTOS et al., 2013.

As serino peptidases também possuem importância para alguns vermes helmintos como *Schistosoma mansoni*, a qual é um dos fatores de virulência mais estudados, isso porque, em sua fase larval e/ou de cercaria, o parasita utiliza de grupos de enzimas proteolíticas, como a serino peptidase, para invasão da pele e tecidos mais profundos. Estudos apontam que a serino peptidase é a mais abundante das proteínas liberadas no processo de invasão parasitária, além de colaborar na evasão do sistema imune, degradando imunoglobulinas (MCKERROW et al., 2006).

Além da virulência, pode-se considerar que as serinos peptidases possuem potencial imunogênico, pois foi visto capacidade protetora de epítomos de uma dessas proteínas contra bactérias como a *Burkholderia pseudomallei* em camundongos (CHIN; TAN; NATHAN, 2012), corroborando a sua escolha para o presente estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os potenciais imunogênicos dos imunógenos de terceira geração pVAX1-FSD e pVAX1-SP em camundongos da linhagem BALB/c, assim como avaliar sua capacidade protetora na leishmaniose tegumentar experimental causada por *L. (L.) amazonensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 dos animais imunizados com pVAX1-FSD e pVAX1-SP e não imunizados;
- Avaliar as alterações dos níveis de IgG1 e IgG2a nos animais imunizados com pVAX1-FSD e pVAX1-SP e não imunizados;
- Avaliar as alterações das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 dos animais desafiados, infectados e saudáveis, assim como a produção de citocinas por células mononucleares incubadas com antígeno total de *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar as alterações dos níveis de IgG1 e IgG2a nos animais desafiados e infectados;
- Avaliar o tamanho da lesão e o parasitismo tecidual dos animais imunizados com os imunógenos pVAX1-FSD e pVAX1-SP e compará-los com os animais infectados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Parasitas

Foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), a qual foi classificada por anticorpos monoclonais e isoenzimas no Instituto Evandro Chagas, Pará, Brasil. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram obtidas a partir do isolamento de formas amastigotas presentes em pata traseira de camundongos BALB/c. Após cerca de 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, realizou-se o debridamento das patas para isolamento e expansão dos parasitas, feito a 25°C, em meio RPMI 1640 (Gibco - EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco - EUA), 1% de HEPES (SIGMA), 10µg/ml de gentamicina e 1000UI de penicilina (meio R10). Todos os experimentos foram realizados com parasitas com no máximo quatro passagens a partir do isolamento e em fase estacionária de crescimento.

3.2. Produção dos imunógenos de DNA

3.2.1. IMUNÓGENOS FSD e SP

Os genes FSD e SP foram sintetizados pela GenScript (EUA). Foi realizada otimização, uma vez que os genes nativos possuíam uma série de códons raros à maquinaria celular de mamíferos, (Anexo A) o que dificultaria a tradução dos genes e a apresentação através do complexo principal de histocompatibilidade.

Através dessa otimização, foi possível adicionar a sequência de Kozak na extremidade 5' dos genes, com a finalidade de facilitar a expressão e tradução das proteínas. A GenScript realizou clonagem desse gene ao vetor pVAX1.

3.3. Produção de bactérias competentes

Escherichia coli selvagens, cepa DH5 α , foram expandidas em 25 mL de meio líquido LB-Broth sem antibióticos até obtenção de uma DO de 0,5. As bactérias foram centrifugadas a 4000rpm, 10min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 25 mL de CaCl₂ 100mM/Hepes 10mM pH 7.0, gelado e estéril. Essas bactérias foram mantidas no gelo por 20 minutos, centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL CaCl₂ 100mM/Hepes 10mM, glicerol 10%, pH 7.0, gelado e estéril, então 100 μ L das bactérias foram aliquotadas em eppendorfs estéreis. Uma parte das bactérias foi congelada a -80°C e a outra parte utilizada nos experimentos de transformação.

3.4. Transformação de bactérias competentes e produção dos Imunógenos de terceira geração

Para cada vacina, realizou-se o seguinte procedimento, descrito a seguir. Cerca de 10 μ L das vacinas de DNA foram adicionadas em 100 μ L de bactérias DH5 α competentes, que então foram mantidas no gelo por cerca de 30 minutos. Em seguida, realizou-se o choque térmico, colocando tais bactérias a uma temperatura de 42°C por 2 minutos, e então, no gelo, por mais 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se cerca de 200 μ L de meio SOC (Sigma) e as bactérias foram então mantidas em estufa a 37°C por 60 minutos, sob agitação. Então, as bactérias foram

centrifugadas a 3500 rpm, 1 minuto, e o *pellet* bacteriano plaqueado em meio LB-Ágar contendo 50µg/mL de kanamicina (Sigma) como método de seleção de bactérias transformadas. As placas foram mantidas em incubadora por cerca de 18h para crescimento das colônias bacterianas. Após o período, algumas colônias de cada uma das placas foram acondicionadas em meio líquido LB-Broth contendo 50 µg/mL de kanamicina, e crescidas por 18h adicionais (pré-inóculo). Posteriormente, cerca de 2mL da cultura tiveram seus plasmídeos purificados através de kit comercial (*NucleoSpin Plasmid kit, MACHEREY-NAGEL*). Foi então realizada uma análise de restrição desses plasmídeos com as enzimas de restrição HindIII e BamHI (*Fermentas Life Sciences*) para confirmação da presença do gene.

Para análise de restrição, foi utilizado 1 µL de cada enzima, 2 µL do tampão de reação, 10 µL da amostra de DNA plasmidial e 6 µL de água livre de endotoxina e RNase. Como controle negativo, utilizou-se, ao invés de DNA plasmidial, 16 µL de água livre de endotoxina e RNase. Essa digestão foi incubada por 15min a 37°C. Em seguida, esse material foi analisado em gel de agarose 1% para confirmação da presença do gene. As culturas bacterianas com a presença do fragmento de 700 pb (FSD) e 1200pb (SP) foram utilizadas para produção de 2,5L de cultura (gigacultura).

Uma alíquota do pré-inóculo (2 mL) foi inoculada em cerca de 2,5L de meio líquido LB-Broth contendo 50 µg/mL de kanamicina, e a cultura foi mantida a 37°C, 150rpm por 18h. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 4000rpm por 10min a 4°C e posteriormente os plasmídeos purificados, utilizando o kit comercial (*Endofree Plasmid Purification Giga Kit, QIAGEN*). Após purificação, a concentração de plasmídeo foi determinada em microespectrofotômetro (Nanodrop).

3.5. Preparação do antígeno total de *L. (L.) amazonensis*

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas, três vezes, em tampão fosfato (PBS) a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* tampão salino fosfato pH 7.4 (PBS) e um conjunto de inibidores de proteases diluído a 1:1000 (Sigma, EUA). Posteriormente, os parasitas foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento a temperatura ambiente. Uma parte dessa solução foi estocada a -80°C (antígeno total – AgT), e a outra foi submetida à centrifugação por 30min, 12000rpm a 4°C, para produção do antígeno solúvel. A concentração de proteínas foi avaliada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se uma curva padrão construída com albumina bovina.

3.6. Animais experimentais

Para os experimentos constantes no presente projeto, utilizou-se 160 camundongos machos da linhagem BALB/c, isogênicos, com 6 semanas de idade. Tais animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os experimentos, utilizando tais animais, foram realizados em conformidade com as normas da comissão para análise de projetos de pesquisas do HCFMUSP (CAPEPESQ) sob o número de protocolo Nº146/12 (ANEXO 2).

3.7. Imunizações experimentais e desafio

As imunizações efetuadas nos diferentes grupos experimentais foram feitas através da via intramuscular, nos músculos gastrocnêmio esquerdo e direito, a intervalos regulares de 15 dias. No total, foram administradas três doses, resultando em 150 µg de vacina por animal. Foram montados dois conjuntos de experimentos, sendo o primeiro relacionado à imunogenicidade dos alvos vacinais.

Nesse caso, foram montados quatro grupos experimentais contendo cinco camundongos por grupo, como segue:

Grupo 1) 50µg de pVAX1-FSD (FSD)/dose

Grupo 2) 50µg de pVAX1-SP (SP)/dose

Grupo 3) 50µg de pVAX1 vazio/dose

Grupo 4) 50µL de PBS (Controle)/dose

Após 21 dias da última imunização, os animais foram anestesiados com solução de tiopental (40mg/kg) e então sacrificados por deslocamento cervical. Soro, linfonodos e baços foram coletados para análise da resposta imune celular e humoral das vacinas de DNA.

O segundo conjunto de experimentos consistiu em avaliar ao potencial profilático dos imunógenos de DNA, assim, foram realizados desafio nos animais imunizados com dos imunógenos (como descrito acima). Nesse caso, foram montados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1) 50µg de pVAX1-FSD (FSD)/dose

Grupo 2) 50µg de pVAX1-SP (SP)/dose

Grupo 3) 50µg de pVAX1 vazio/dose

Grupo 4) 50µL de PBS (Controle)/dose

Grupo 5) 50µL de PBS (Infectado)/dose

Após 21 dias da última imunização, todos os grupos receberam o inóculo de 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no coxim plantar esquerdo,

exceto o grupo controle, que recebeu apenas 50 μ L de PBS sob a mesma rota. O desenvolvimento das lesões cutâneas foi acompanhado por oito semanas.

3.8. ANÁLISES IMUNOLÓGICAS

3.8.1. FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T

Células extraídas dos linfonodos de todos os grupos experimentais foram contadas com azul de Trypan e, então, cerca de 10^6 células foram acondicionadas em placas de 96 poços, com fundo em formato de V. Essas células foram lavadas com tampão de lavagem gelado (2 mM EDTA; 0,5% BSA em PBS), por três vezes, e então foi efetuada a marcação de superfície, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 α (PerCP-Cy5.5), anti-CD4 L3T4 (FITC), anti-CD8 α (Alexa Fluor 700), anti-CD44i (APC-Cy7) e anti-CD62L (PerCP) em 50 μ L finais de tampão de lavagem. Essa placa foi mantida a 4°C por 30 minutos no escuro. Passado este período, a placa foi lavada três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Para iniciar a marcação intracelular, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização (e-Bioscience), e os anticorpos monoclonais anti-IFN- γ (PE), anti-TNF- α (APC), anti-IL-4 (Pe-Cy7) e anti-IL-10 (Pacific blue) foram adicionados aos poços, em 50 μ L finais de reação em tampão de permeabilização. Essa placa foi mantida a 4°C por 30 minutos no escuro. Os poços contendo as células foram lavados por mais duas vezes com o tampão de permeabilização. Em seguida, as células foram fixadas com 100 μ L de paraformaldeído 1%.

A estratégia de análise se baseou na identificação inicial das células CD3 $^+$, seguido pelas células CD3 $^+$ CD4 $^+$ e CD3 $^+$ CD8 $^+$. Tais populações linfocitárias foram em seguida caracterizadas por sua produção intracelular de citocinas, conforme esquematizado na figura 9.

Figura 9: Estratégia de *gate* utilizada para fenotipar populações de linfócitos T CD4 produtores de citocinas, a mesma metodologia foi utilizada para caracterizar as populações de linfócitos T CD8 produtores das mesmas citocinas.

Para a identificação de linfócitos de memória efetora e central, foi feito um *gate* nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8; em cada uma dessas populações, foi avaliada a marcação dos anticorpos CD44i, sendo que, células que possuíam maiores expressão desse marcador, foram selecionadas (CD44^{high}). Essa subpopulação foi novamente fenotipada com o marcador CD62L e populações com alta expressão do marcador (CD62L^{high}) foi considerada como linfócitos de memória central, enquanto populações com baixa expressão do marcador (CD62L^{low}) foi considerada como linfócitos de memória efetora (OBAR, LENFRANÇOIS, 2010; JEONG et al., 2014), conforme ilustrado na figura 9. Nessas populações, também foi realizada a fenotipagem das populações produtoras de citocinas, utilizando a mesma metodologia descrita na figura 10.

Figura 10: Estratégia de *gate* utilizada para fenotipar populações de linfócitos T CD4 de memória efetora e central, a mesma metodologia foi utilizada para caracterizar linfócito T CD8.

A aquisição das amostras foi feita em um citômetro FACS Canto II (B&D). Para compensação, foram utilizadas *beads* (BD Bioscience) monomarcadas com cada um dos anticorpos utilizados. Foram adquiridos cerca de 10^6 eventos para cada grupo experimental e os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo para MAC (TreeStar, EUA).

Após aquisição de dados no *software*, foi calculada a frequência média de cada uma das populações linfocitárias produtoras de citocinas. A estratégia de *gate* para análise da população de células T CD4 e CD8 de memória central e efetora foi avaliada de acordo com Passero 2011 e Obar & Lenfrancois 2010.

3.9. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Os linfonodos dos grupos experimentais foram macerados e lavados em meio R10. Em seguida, as células foram contadas com auxílio de azul de Trypan e as suas concentrações ajustadas a 10^6 células/poço em placas de 96 poços. Em seguida, as células foram estimuladas com antígeno total de formas promastigotas ($10\mu\text{g/mL}$) de *L. (L.) amazonensis*, com Concanavalina A ($1,0\mu\text{g/mL}$) (controle positivo), e células sem estímulo algum foram cultivadas somente com R10 (controle negativo). As placas foram incubadas por 72h em estufa umidificada a 37°C , 5% CO_2 , após o período de estímulo as placas foram centrifugadas a 1000 RPM, e o sobrenadante foi coletado para quantificação dos níveis de $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-4 e IL-10 através de ELISA, usando *kits* comerciais (eBioscience).

3.10. Análise da resposta imune humoral

Para avaliar a resposta imune humoral dos grupos experimentais, placas de ELISA de 96 poços de alta ligação (Costar, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* a uma concentração de proteínas de $1,0\mu\text{g/poço}$ em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (100mM NaHCO_3 ; $6\text{mM Na}_2\text{CO}_3$), por 18h a 4°C . Após esse período, as placas foram lavadas três vezes em PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST), e bloqueadas com leite desnatado a 10% diluído em PBS por 120min a 37°C . Em seguida, a placa foi novamente lavada, 3 vezes com PBST, e então $100\mu\text{L}$ dos soros dos grupos experimentais foram adicionados aos poços nas diluições de 1:20 (nos estudos de imunogenicidade) e 1:200 (para os estudos de desafio). Soros de camundongos BALB/c cronicamente infectados com a *L. (L.) amazonensis* foram adicionados aos poços como controle positivo. Controles positivos foram feitos usando soros de

camundongos. Soros dos animais saudáveis foram utilizados como controles negativos das reações. Todas as amostras foram incubados por 60min a 37°C, em seguida, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBST seguido pela adição de 100µL de anticorpo secundário anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:8000 e 1:16000 respectivamente por 60 minutos a 37°C. Após esse período, mais três lavagens com PBST foram efetuadas, e 100 µL do substrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina com peróxido de hidrogênio (TMB) (B&D) foi adicionado aos poços por cerca de 15 min, quando então a reação foi finalizada pela adição de 50 µL H₂SO₄, 2N. A placa foi então analisada em leitor de ELISA a 450nm. Os dados foram apresentados como Unidade ELISA (UE), conforme previamente indicado em Todolí e colaboradores (2009).

3.11. Tamanho de lesão e carga parasitária

O desenvolvimento das lesões cutâneas foi acompanhado semanalmente com auxílio de um micrômetro digital por oito semanas. Após o período, os animais foram anestesiados com solução de tiopental (40mg/kg) e então sacrificados por deslocamento cervical. Nesse caso, para a determinação da carga parasitária, por diluição limitante, a lesão foi debridada de maneira estéril, o fragmento obtido foi pesado, macerado em meio de cultura Schneider (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10µg/mL de gentamicina e 1000UI de ampicilina, na proporção de 1:1000 e posteriormente 200µL desse macerado foi adicionado em uma placa de 96 poços estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (1:4) desse material em sextuplicatas, nas próprias placas, as mesmas foram vedadas para evitar a evaporação e então incubadas a 25°C, por 15 dias, para que houvesse diferenciação de amastigota para promastigotas. Após esse período, cada placa foi observada, e a maior titulação em que foi possível observar formas promastigotas foi anotada para avaliação da carga parasitária tecidual conforme Titus e colaboradores (1985):

$\text{Carga parasitária} = \frac{\text{recíproco do maior título positivo} \times \text{diluição do material} \times (\text{vol. homogeneizado} / \text{vol. 1}^{\circ} \text{ poço} \times \text{diluição})}{\text{Peso do órgão}}$

3.12. Análise Estatística

Os dados foram analisados inicialmente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de múltiplos grupos. Uma segunda análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes. Os grupos foram considerados significativamente diferentes uns dos outros, quando obteve-se $p < 0,05$. Os testes estatísticos foram efetuados no *software* GraphPad Prisma 5.0. Foram realizados três experimentos independentes, e os resultados foram apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de tais experimentos.

4. Resultados

4.1. Análises de restrição dos plasmídeos pVAX1-FSD e pVAX1-SP

Para verificar a presença do inserto (FSD) no plasmídeo (pVAX1), uma análise de restrição foi realizada com as enzimas (HindIII e BamHI), e como pode se observar na figura 11A a presença do gene foi comprovada, pois se observou uma banda com um tamanho aproximado de 700pb no gel de agarose. Na figura 11B, observa-se a sequência de nucleotídeos do gene codificador da enzima FSD. Destacado em azul, estão os sítios de restrição das enzimas (HindIII e BamHI) e, em vermelho, a presença da sequência de Kozak.

Figura 11: Análise de restrição, utilizando as enzimas HindIII e BamHI, foi efetuada no plasmídeo pVAX1 contendo o gene FSD, onde se obteve um fragmento de aproximadamente 700pb (A), o qual foi identificado pelo sequenciamento do gene (B). Destacado em azul, estão as enzimas de restrição (HindIII e BamHI, respectivamente) e, em vermelho, a sequência de Kozak.

A análise de restrição, efetuada para o gene codificador da enzima SP, mostrou que o tamanho desse gene foi de aproximadamente 1200 pb (Figura 11A), e o sequenciamento demonstrou que este fragmento realmente se trata do gene SP. Na figura 11B, temos a sequência e, destacado em azul, estão os sítios de restrição para este gene (HindIII e BamHI) e da sequência de Kozak em vermelho.

Figura 11: Análise de restrição, utilizando as enzimas HindIII e BamHI, foi efetuada no plasmídeo pVAX1 contendo o gene SP, onde se obteve um fragmento de aproximadamente 1000pb (A), o qual foi identificado pelo sequenciamento do gene (B), destacado em azul, estão as enzimas de restrição (HindIII e BamHI) respectivamente e, em vermelho, a sequência de Kozak.

4.2. Análise dos potenciais imunogênicos dos imunógenos pVAX1-FSD e pVAX1-SP

4.2.1. Fenotipagem de linfócitos T

A imunofenotipagem de linfócitos T CD4 produtores de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 (Figura 12A) dos grupos imunizados mostrou que não houve alterações significativas em relação ao controle.

Por outro lado, houve diminuição significativa da população de linfócitos TCD8⁺ (Figura 12B) produtores de IFN- γ nos grupos vacinados com pVAX1-FSD e pVAX1-SP quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Resultados similares foram encontrados na população linfócitos produtores de TNF- α do grupo FSD. Além disso, foi detectado aumento significativo da frequência de linfócitos produtores de IL-10 do grupo SP em relação ao grupo controle e ao grupo pVAX1 ($p < 0,05$).

Figura 12: Análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ (A) e CD8 (B) produtores de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 *ex vivo*. * $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo controle. ** $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de TNF- α do grupo Controle. ## $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo Controle. ++ $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo pVAX1.

Em relação à população de linfócitos TCD4 de memória central e efetora, os quais foram fenotipados como CD3⁺CD4⁺CD44i^{high}CD62L^{high} e CD3⁺CD8⁺CD44i^{high}CD62L^{low} respectivamente, também não foram encontradas

diferenças significativas entre as populações produtoras das citocinas avaliadas dos grupos imunizados com os controles ($p < 0,05$), como pode-se observar na figura 13.

Figura 13: Análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ de memória, central (A) e efetora (B) produtores de citocinas de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 *ex vivo*.

Em relação aos linfócitos T CD8, observou-se como indicado na figura 14A que os linfócitos TCD8⁺ de memória central produtores de IFN- γ dos grupos vacinados com FSD e SP apresentam uma diminuição significativa na frequência em comparação ao controle ($p < 0,05$), observou-se resultado similar na frequência de produtores de IL-4 do grupo FSD. Além disso, foi observado diminuição significativa na frequência linfócitos TCD8⁺ de memória efetora produtores de IL-4 dos grupos FSD e SP em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 14B).

Figura 14: Análise da frequência de linfócitos TCD8⁺ de memória, central (A) e efetora (B) produtores de citocinas de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 *ex vivo*. * $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo Controle.

4.2.2. Avaliação da imunidade humoral

Em relação à imunidade humoral, observou-se na figura 15 que não houve alterações significativas na produção de IgG1 (A) nos grupos imunizados quando comparados ao controle. Por outro lado, os níveis de IgG2a (B) foram significativamente maiores nos grupos imunizados com pVAX-FSD e SP quando comparados ao controle, porém são similares ao grupo pVAX1, o qual também apresentou aumento dos níveis desse isótipo quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Figura 15: Análise da resposta imune humoral dos animais imunizados com pVAX1-FSD e pVAX1-SP. Resultados apresentados em Unidades Elisa dos isótipos de anticorpos, (A) IgG1 e (B) IgG2 presentes no soro de camundongos dos grupos experimentais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

4.3. Análise dos potenciais protetores dos imunógenos pVAX1-FSD e pVAX1-SP

4.3.1. Fenotipagem de linfócitos T

Os estudos de imunofenotipagem mostraram que houve aumento ($p<0,05$) da frequência dos linfócitos TCD4(A) produtores de IFN- γ e TNF- α nos grupos imunizados com FSD e SP, e no grupo injetado com pVAX1 comparado ao grupo infectado (não imunizado). De maneira similar, um aumento da frequência de linfócitos produtores de IL-10 no grupo imunizado com SP em relação ao grupo pVAX1 também foi detectado (figura 16).

Também foi observada diminuição significativa de linfócitos T CD8⁺ (B) produtores de TNF- α em todos os grupos imunizados quando comparados ao grupo infectado. A frequência de linfócitos produtores de IFN- γ só mostrou aumento significativo ($p<0,05$) no grupo vacinado com FSD em relação ao Infectado. Os grupos vacinados com FSD e SP também mostraram aumento ($p<0,05$) da frequência de linfócitos produtores de IL-4 quando comparados com os grupos infectado e injetado com pVAX1.

As frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas do grupo controle estiveram em níveis basais, mostrando-se menores do que aqueles que foram desafiados e infectados, como se pode observar na figura 16.

Figura 16: Análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ (A) e CD8 (B) produtores de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 *ex vivo*. * $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo Infectado. ** $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de TNF- α do grupo Infectado. # $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo Infectado. ## $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo Infectado. + $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo pVAX1. ++ $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo pVAX1.

A figura 17 (A) mostra a frequência de linfócitos T CD4 de memória central (A) e efetora (B) produtores de citocinas. Na figura 17A, observa-se um

aumento significativo ($p < 0,05$) nas frequências de linfócitos produtores de IFN- γ dos grupos pVAX-1 e SP em relação ao grupo infectado, porém, em relação ao grupo pVAX-1, detectou-se diminuição significativa. O grupo FSD só apresentou diminuição significativa na frequência de linfócitos produtores de IL-10 em relação ao grupo Infectado e ao grupo contendo somente o vetor (pVAX1). Níveis basais foram encontrados no grupo controle onde a diferença relevante se dá nas frequências de TNF- α e IL-4 diretamente comparadas ao grupo Infectado.

Observando a figura relativa aos linfócitos T CD4 de memória efetora (B), sugere-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de linfócitos produtores de TNF- α do grupo FSD, assim como a frequência dos produtores de IL-10 do grupo SP, em comparação ao grupo Infectado. Níveis basais de IFN- γ e IL-4 encontrados no grupo Controle em relação ao Infectado.

Figura 17: Análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ de memória, central (A) e efetora (B) produtores de citocinas de IFN- γ , TNF- α , IL4 e IL-10 *ex vivo*. * $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo Infectado. # $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo Infectado. ## $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo Infectado. § $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo pVAX1. §§ $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de TNF- α do grupo pVAX1. ++ $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-10 do grupo pVAX1.

Em relação à frequência de linfócitos TCD8⁺ de memória central (Figura 18A), observou-se uma diminuição significativa na população produtora de TNF- α de todos os grupos em comparação ao infectado ($p < 0,05$). Houve também uma diminuição significativa na frequência de linfócitos TCD8⁺ de memória efetora (Figura 18B) produtores de TNF- α nos grupos FSD e SP e Controle em relação ao infectado. Aumento da frequência da população produtora de IL-4 nos grupos FSD e SP em comparação ao grupo Infectado. Grupo controle somente mantendo níveis basais significantemente diminuídos em relação ao grupo Infectado.

Figura 18: Análise da frequência de linfócitos TCD8⁺ de memória, central (A) e efetora (B) produtores de citocinas de IFN-γ, TNF-α, IL4 e IL-10 *ex vivo*. *p<0,05 em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN-γ do grupo Infectado. **p<0,05 em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de TNF-α do grupo Infectado. #p<0,05 em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo Infectado.

4.3.2. Quantificação de Citocinas

Quantificando as citocinas da cultura celular de linfócitos, observou-se um aumento na produção de IFN- γ e IL-4 no grupo pVAX1-FSD em relação ao grupo Infectado (Figura 19).

Figura 19: Níveis de citocinas produzidos pela cultura de células mononucleares **extraída** de linfonodos foram estimuladas com antígeno total durante 72h. * $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IFN- γ do grupo Infectado. # $p < 0,05$ em comparação a frequência dos linfócitos T produtores de IL-4 do grupo Infectado.

4.3.3. Imunidade humoral

A análise da resposta imune humoral não demonstra diferença significativa entre os grupos vacinados e o grupo Infectado em relação à produção de anticorpos do subtipo IgG1 (Figura 20 A), no entanto se percebe que o grupo controle mostra somente níveis basais do isótipo. Porém, em IgG2a (Figura 20 B), observa-se que existe uma tendência biológica de aumento gradual nos grupos vacinados.

Figura 20: Análise da resposta imune humoral dos animais imunizados com pVAX1-FSD e pVAX1-SP e desafiados com 10^6 formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Resultados apresentados em Unidades Elisa dos isótipos de anticorpos, (A) IgG1 e (B) IgG2 presentes no soro de camundongos dos grupos experimentais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

4.3.4 Tamanho de lesão

Exame do tamanho de lesão de lesão mostrou que em nenhum período experimental avaliado foi encontrada diferenças significativas no tamanho de lesão de pele dos camundongos vacinados quando comparado aos controles, só injetados com pVAX1 e o grupo Infectado (figura 21).

Figura 21: Mensuração do tamanho de lesão dos diferentes grupos experimentais. Foram realizadas medidas semanais, por um período total de oito semanas; em A, tem-se a comparação do tamanho de lesão do imunógeno pVAX1-FSD e, em B, do imunógeno pVAX1-SP. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Infectado.

4.3.5. Carga parasitária

A carga parasitária, avaliada no ponto de inoculação do parasita (coxim plantar), mostrou apenas alteração no grupo imunizados com pVAX1-FSD em relação ao grupo controle infectado (Figura 22).

Figura 22: Análise da carga parasitária realizada por diluição limitante após oito semanas de infecção por *L(L) amazonensis*. Amostras retiradas e maceradas da lesão tecidual do coxim plantar, ponto inicial de lesão dos camundongos dos grupos imunizados comparados com o grupo infectado. * $p < 0,05$ em comparação da carga parasitária em relação ao grupo Infectado.

5. Discussão

Diante da importância da leishmaniose tegumentar americana como problema de saúde pública, é fundamental o desenvolvimento de estratégias para prevenção da doença, para assim diminuir o número de pacientes submetidos aos tratamentos quimioterápicos, os quais possuem uma série de efeitos colaterais, tais como reações dérmicas locais, vômitos, náuseas, mialgias e, em casos mais raros, óbito (PINHEIRO, 2004, HANDMAN 2001). Portanto, o desenvolvimento de estratégias de vacinação seria uma das melhores medidas profiláticas.

O presente trabalho avaliou o potencial imunogênico e protetor de dois imunógenos de terceira geração, compostos pelos genes ferro superóxido dismutase e serino peptidase. O alvo vacinal FSD tem sido objeto de estudos promissores em relação ao diagnóstico, sugerindo que esse antígeno possui capacidade imunogênica. Devido à sua ampla distribuição na família Tripanossomatidae e ao fato de ser uma proteína/enzima secretada, pode contribuir para sua apresentação, levando a respostas imunológicas específicas. Essa enzima, junto com outras de sua família, também possui um papel vital para sobrevivência do protozoário durante a infecção, uma vez que possui atividade antioxidante. Da mesma maneira, a enzima serino peptidase também desempenha funções importantíssimas para a sobrevivência do parasita no hospedeiro, como quebra de proteínas e invasão de tecidos (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). Portanto, o bloqueio de sua atividade por células imunes primadas poderia ocasionar um efeito protetor ao hospedeiro (LONGONI, MARIN E SANCHEZ-MORENO, 2014).

Além disso, estudos *in silico*, realizados anteriormente pelo nosso grupo, mostraram que tais antígenos seriam capazes, após processamento, de se ligar a molécula de MHC I de camundongos, estimulando, portanto, uma resposta de linfócitos T citotóxicos. Também há relatos que sugerem que as enzimas FSD e SP, utilizadas no presente estudo, são imunogênicas e de íntima ligação com a virulência de parasitas intracelulares, sugerindo suas aplicabilidades para estudos imunológicos. Assim, avaliou-se o potencial imunogênico e protetor dos alvos vacinais utilizados no presente estudo.

Nos estudos de imunogenicidade, verificou-se que a imunização experimental com as vacinas de DNA mostrou que as populações de linfócitos T CD4 produtores de citocinas não alteraram significativamente suas frequências quando comparadas aos controles. Porém os animais imunizados com pVAX1-FSD apresentaram diminuição de populações de linfócitos T CD8 produtores de IFN- γ e TNF- α . A imunização com pVAX1-SP também gerou diminuição da população de linfócitos T CD8 produtores de IFN- γ acompanhado de um aumento na frequência de linfócitos produtores de IL-10. Em imunizações experimentais, os linfócitos T CD8 desempenham extrema importância na indução de imunidade associada à proteção contra patógenos intracelulares (RODRIGUES et al., 2003). E, dependendo da resposta ao antígeno utilizado na imunização, estas células podem apresentar perfis dicotômicos representado pelo perfil T citotóxico 1 (Tc1), os quais produzem basicamente IFN- γ e TNF- α , e T citotóxico 2 (Tc2) relacionados a produção de IL-4 e IL-10 (GANGULY et al 2008). Embora sejam classificadas de acordo com sua produção de citocinas, ambas as populações possuem incontestável potencial citotóxico (TRAPANI e SMYTH, 2002), sendo que a indução de uma resposta do tipo Tc2 pode ser considerada como não protetora a modelos de parasitismo intracelular. Dessa forma, os resultados obtidos indicam um baixo potencial imunogênico das vacinas, pois os grupos de células com potencial resolutivo se mostraram inalterados (basais) ou diminuídos em relação ao controle. Um fator que deve ser levado em consideração é que as células primadas pelas vacinas podem estar em circulação, ou seja, fora dos órgãos linfoides que foram analisados, o que pode ter afetado os resultados de imunofenotipagem, até mesmo porque foram encontradas frequências similares de linfócitos T CD4 e CD8 (dados não mostrados) nos animais imunizados e controles, evidenciando que os animais imunizados não apresentaram imunossupressão causada pela vacina.

Para indução de uma resposta imunológica de longa duração é necessária a formação de uma resposta adaptativa, seguida da formação de uma memória imunológica duradoura e específica. A memória imunológica permite que o sistema imune construa rapidamente uma resposta mais forte e eficaz contra determinado antígeno após um reencontro (ROITT, BROSTOFF, MALE, 2001), e é dividida em dois *subsets* de células baseadas na sua capacidade de migração, proliferação e função efetora. Essas células são fenotipadas como células de

memória central que se localizam fixas nos órgãos linfoides secundários, tendo alto poder de proliferação, e células de memória efetora, localizadas circulantes em tecidos periféricos como sangue e o baço, sendo a primeira linha de defesa em casos de reexposição a patógenos, e capazes, assim, de produzir citocinas resolutivas que conduzem a eliminação do patógeno (MULLER et al., 2013).

Com isso, o resultado de memória imunológica de tal experimento teve como alteração mais marcante a diminuição da frequência de populações de linfócitos T CD8 de memória central e efetora produtores de IL-4 em ambos os imunógenos. Aparentemente, seria interessante tal diminuição dessas populações, visto que, na leishmaniose cutânea, esta citocina está associada à progressão da doença, pois auxilia a supressão de IL-12, comprometendo a formação da resposta Th1 de caráter resolutivo (NATION, DONJI, STRYKER, 2012). Por outro lado, é sugerido que IL-4 é essencial para a formação da memória imunológica. Foi visto que, *in vitro*, linfócitos T CD8 se diferenciam em células de memória e são posteriormente ativados quando os antígenos são apresentados na presença de IL-4, e que outras citocinas, julgadas importantes para manutenção da produção de IFN- γ , como IL-12 e IL-2, não tiveram a mesma capacidade (HUANG et al, 2000), mostrando o papel chave que essa citocina pode desempenhar. Além disso, Carvalho e colaboradores (2002) afirmam que a presença de IL-4 é fundamental para uma sinalização cruzada entre os diferentes linfócitos, tal sinal permite que os linfócitos T sejam capazes de melhor combater parasitas intracelulares como *Plasmodium* sp. (CARVALHO et al., 2002) e até mesmo *Leishmania* (STAGER et al., 2003), pois tal citocina influencia na permanência dos linfócitos T recém ativados, evitando sua morte prematura.

Mesmo tais resultados indo contra conceitos de que IL-4 tenha papel inibitório para ativação de linfócitos Th1, tal trabalho mostra que camundongos bloqueados de IL-4 e imunizados com o parasita e que receberam transferência de linfócitos T exógenos tem sua interação entre os linfócitos T comprometida, diminuindo a formação de uma resposta celular específica e protetora Th1 (CARVALHO et al., 2002). Deve-se considerar que, acompanhando a diminuição da frequência de linfócitos T CD8 de memória produtores de IL-4, observados no presente estudo, houve também a diminuição da frequência da população T CD8 de

memória central produtora de IFN- γ nos dois grupos imunizados, podendo comprometer a eficácia da imunização.

Além desses achados, resultados referentes à resposta imune humoral demonstraram que os níveis de IgG1 dos animais imunizados foram similares ao do controle. Por outro lado, foi observado aumento significativo dos níveis de IgG2a nos animais imunizados com FSD e SP. Tem sido relatado que o isótipo IgG1 se correlaciona estritamente com a indução de uma resposta Th2, enquanto IgG2a se correlaciona com uma resposta Th1 (COFFMAN, LEBMAN e ROTHMAN 1993; FERREIRA et al., 2008). Os dados de imunidade humoral mostram que há uma tendência de indução de resposta Th1 nos animais imunizados, porém não foi observada alteração da imunidade celular associada a uma resposta Th1 ou mesmo Tc1. Possivelmente, essa indução deve ter ocorrido durante as imunizações e então regredido para níveis basais após 21 dias da última imunização (ROITT, BROSTOFF e MALE, 2001), além disso, as células efectoras podem estar em circulação (NAOUAR 2014).

Com base nos achados, principalmente associados à diminuição das populações de linfócitos T CD8 produtores de IL-4 e o aumento dos isótipos IgG2a anti-FSD e SP, avaliou-se os potenciais protetores destes imunógenos, usando o modelo de infecção experimental causado por *L. (L.) amazonensis*, uma espécie patogênica no modelo murino BALB/c (ANDRADE et al., 1984).

Analisando os dados de imunofenotipagem, animais vacinados com pVAX1-FSD e SP apresentaram aumento de linfócitos T CD4 Th1, e os imunizados com SP também apresentaram aumento de linfócitos T CD4 produtores de IL-10. É sabido que a citocina IFN- γ é essencial para a eliminação de formas amastigotas de *Leishmania*, pois induz a ativação de macrófagos e a síntese de derivados de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e nitrogênio, óxido nítrico, que são capazes de eliminar parasitas intracelulares. A presença de linfócitos T CD4 produtores de TNF- α também pode ser crucial para ativação de macrófagos, levando a eliminação dos parasitas, além disso, a ação conjunta de IFN- γ e TNF- α se mostra extremamente importante para aquisição de resistência contra a infecção (LIEW et al., 1990). Embora tenha sido obtido esse perfil benéfico contra infecção, não houve diminuições significativas das populações produtoras de IL-4 e IL-10, que são prejudiciais para a evolução da doença. Além disso, é possível que a presença dos

linfócitos Th2, nos animais desafiados, tenha inibido a expansão adequada de populações de células Th1, ou inibido que as citocinas pudessem desempenhar o seu papel biológico, como demonstrado em trabalhos anteriores (NGURE et al., 2014).

Relativamente ao estudo de memória imunológica, foi visto que os animais imunizados com pVAX1-FSD não apresentaram alterações na frequência de linfócitos T CD4 centrais e efetores do tipo Th1, porém os grupos imunizados com pVAX1-SP e pVAX1 apresentaram aumento de linfócito T CD4 de memória central produtor de IFN- γ . Essa população é capaz de armazenar a informação do antígeno, e, em caso de reinfecções a expansão celular específica, seria mais rápida e eficiente, levando a formação de células de memória efetoras com capacidade de circular na periferia e de ativar células apresentadoras de antígeno infectadas (MULLER et al., 2013). Entretanto, o que se observou nessa imunização foi que, mesmo com a frequência aumentada de células de memória central produtoras de IFN- γ , a conversão para células T CD4 de memória efetoras produtoras de IFN- γ perante estímulo constante de parasitas e seus antígenos acabou não sendo proporcional, sugerindo que a capacidade patogênica do parasita pode ter inibido tal conversão.

No entanto, esse aumento da frequência de células produtoras de citocinas Th1 não necessariamente mostra que as vacinas possuem capacidade de polarizar para uma resposta benéfica, pois foi verificado que os grupos imunizados não diferem do grupo inoculado com o vetor (pVAX1), mostrando, assim, um possível efeito de *background* do plasmídeo, que possui uma capacidade imunogênica não específica, por apresentar em sua estrutura molecular regiões ricas em CpG (NASCIMENTO et al., 2002), que é considerado um adjuvante imunológico ligante de TLR9, o qual induz uma resposta polarizada para um perfil Th1, e vem sendo frequentemente usado em imunização na leishmaniose experimental (CAMPBELL et al., 2014; SHIVAHARE et al., 2014).

Referente aos linfócitos T CD8, o grupo imunizado com pVAX1-FSD demonstrou um aumento na frequência de população produtora de IFN- γ em relação ao grupo infectado, porém a de TNF- α diminuiu em ambos imunógenos e no grupo pVAX1 quando comparado ao grupo infectado; esses valores, no entanto, são similares ao grupo controle (saudável). Somado a isso, um aumento significativo

ocorreu nas populações produtoras de IL-4 em ambos os imunógenos. Como visto nos linfócitos T CD4, um *background* de pVAX1 pode ser responsável pelo aumento da frequência da população produtora de IFN- γ . Contudo, o aumento referente à população produtora de IL-4 em pVAX1-FSD mostrou ser significativamente maior comparado ao grupo só injetado com o vetor, sugerindo que essa diferença provém diretamente do antígeno. Tais dados evidenciam que os imunógenos induziram um perfil misto de resposta imunológica (Tc1 e Tc2) no decorrer do desafio. Somado a isso, possivelmente a frequência de células benéficas está associada à imunogenicidade do vetor.

Além disso, foi detectado frequências aumentadas de linfócitos T CD8 de memória efetora produtores de IL-4, sugerindo que as imunizações com estes candidatos induzem, principalmente, populações de memória do tipo Tc2.

Assim, de maneira indireta, a citocina produzida pelos linfócitos T CD8 prevalente no desafio foi a IL-4 no grupo pVAX1-FSD e pVAX1-SP, a qual possui um papel distinto conforme a etapa do processo imunológico, pois, no período pré-desafio, onde as imunizações ocorrem, sua função pode estar associada à manutenção de células primadas para formação da memória imunológica, processo fundamental na vacinação (HUANG et al., 2000), portanto, os resultados obtidos no experimento de imunogenicidade mostraram que números basais de células produtoras de IL-4 deve ter comprometido a formação de memória imunológica associada a proteção. Em contrapartida, essas células, em números superiores ao controle, durante o desafio, onde a doença se estabelece, deve apresentar um papel inibitório sobre as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e/ou Tc1, seja inibindo sua secreção (NELMS et al., 1999) ou na sua bioatividade sobre células alvo, tal como macrófagos infectados.

A análise quantitativa das citocinas (ELISA) demonstrou concordância com as frequências das populações celulares, pois se observou o aumento na citocina IFN- γ que foi compatível com os dados de frequência celular (citometria). De maneira interessante, isso é observado nos grupos imunizados em comparação ao Infectado e também quando se trata de linfócitos TCD8 produtores de IL-4 e TNF- α , mostrando que, respectivamente, o aumento e a diminuição dessas citocinas também estão de acordo com as alterações vistas nas frequências celulares.

Comumente na literatura encontra-se que a resposta imune humoral, quando em altos títulos, tende a marcar a progressão da doença em modelos murinos (PASSERO et al., 2010). Dessa forma, os testes de imunogenicidade demonstram alterações significantes somente referentes ao subtipo de anticorpos IgG2a, onde ambos os grupos vacinados demonstram um aumento desses títulos em relação ao controle, sugerindo que uma resposta Th1 pode ter sido formada durante o processo de imunização, mas, devido ao tempo decorrido ou perante desafio do parasita, a polarização diminuiu. O experimento de desafio não demonstrou diferenças estatísticas para nenhum isótipo, porém, similar ao teste de imunogenicidade, observa-se uma tendência ao aumento dos títulos de IgG2a nos grupos vacinados em comparação ao infectado, além do aumento do nível de IgG2a nos grupos imunizados. Também se observa no grupo pVAX1-FSD níveis similares de IgG1 e IgG2a. Esses dados reforçam a ideia de que, principalmente no grupo imunizado com pVAX1-FSD, ocorreu a indução de uma resposta Th1; por outro lado, os grupos com maiores níveis de IgG1 tendem a montar uma resposta basicamente do tipo Th2, uma vez que há forte associação entre IL-4 e a produção de IgG1, assim como IFN- γ e IgG2a (COFFMAN, LEBMAN e ROTHMAN 1993; FERREIRA et al., 2008).

Principalmente nos animais imunizados com pVAX1-FSD, observou-se a indução de uma resposta imunológica mista, com a presença de altos níveis de IFN- γ , IL-4 e IgG2a, o que se correlacionou com diminuição do parasitismo cutâneo em relação ao controle. Entretanto, o tamanho de lesão se mostrou pouco diminuído, possivelmente devido ao aumento de linfócitos T produtores de IL-4.

Em 2011, Daifalla e colaboradores avaliaram o potencial protetor da FSD em sua forma recombinante, a qual foi administrada com os adjuvantes CpG e o GLA-SE em camundongos BALB/c utilizando via subcutânea. Os resultados mostraram que os grupos imunizados com rSODB1+adjuvantes apresentaram maiores níveis de IgG2a, que se aproximaram aos de IgG1, sendo um achado importante, pois demonstra a polarização da resposta imunológica para Th1; interessante, essa aproximação entre os níveis das IgGs também são encontrados no presente estudo. Ainda no trabalho de Daifalla, foi observado outro achado similar com o presente trabalho, que é o aumento da citocina IFN- γ (Th1) acompanhada por IL-10 (Th2), novamente reforçando nossos achados que

consistem em um aumento de IFN- γ , porém acompanhados pela citocina IL-4 (Th2). Dessa maneira, observou-se que ambos os resultados são similares independente da formulação vacinal utilizada, sugerindo, dessa forma, que o mecanismo de ação do antígeno FSD é similar entre as espécies de *Leishmania*.

Baseado nos achados, observamos que o imunógeno pVAX1-FSD protege parcialmente os animais vacinados, porém não suficientemente para induzir cura. Contudo, deve-se ressaltar que o presente trabalho foi desenvolvido baseado em uma cepa de extrema virulência oriunda de um caso de leishmaniose anérgica difusa humana e usada para infectar um modelo extremamente susceptível; dessa forma, induzir proteção nesse contexto é um grande desafio que foi parcialmente alcançado.

6. Conclusão

As vacinas de DNA pVAX1-FSD e pVAX1-SP se mostraram pouco imunogênicas, porém levaram a uma supressão na frequência de linfócitos produtores de IL-4, associado ao aumento da produção do isótipo IgG2a, o qual é um marcador indireto de uma resposta Th1.

Os animais imunizados com quem com os imunógenos e desafiados apresentaram uma resposta imunológica mista, com a participação de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4. Além disso, altos níveis de IFN- γ e IL-4 foram encontrados nas culturas de linfonodos desses animais.

Dessa maneira, o Imunógeno mais promissor foi pVAX-FSD, no entanto não se alcançou proteção completa contra o parasita, apenas uma diminuição na carga parasitária que não acarreta na cura da doença, pois o tamanho de lesão se mostrou pouco diminuído.

Portanto, o presente trabalho demonstrou que os antígenos desencatilharam respostas imunológicas mistas, sendo não resolutivas aos animais imunizados com pVAX1-SP e parcialmente protetora para pVAX1-FSD.

Referências

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. 2006. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro. Editora Revinter Rio de Janeiro, 49-51.
- AGUILAR-BE I, et al. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. **Infect Immun**, v.73,p.812–9, 2005.
- AHMED, S.B.H. et al. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine due to *L major*. **Vaccine**, v.22, 1631–9, 2004.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A.F. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e póscolombianas. **História, Ciências, Saúde**, v.10, p.853-82, 2003.
- ANDRADE, Z.A. et al. Immunopathology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Am J Pathol**, v.114, p137-148, 1984.
- BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. **Critical Reviews in Biochemistry**, v.22, p.111-180, 1987.
- BARRAL, A. COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose tegumentar nas Américas**.Salvador:Cyted, 2011, 248p.
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN. The MEROPS Database as a Protease Information System. **Journal of Structural Biology**, v.134, p.95–102, 2001.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.328-337, 2004.
- BASTOS, I.M.D. et al. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, Leishmaniasis and African trypanosomiasis. **Curr Med Chem**, v.20, p.3103-3115, 2013.

BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as example. **Cell Microbiol.** v.10, 1221–1234, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO**. v.17, p.4975–4986, 1998.

CAMPBELL, J.D. et al. A limited CpG-containing oligodeoxynucleotide therapy regimen induces sustained suppression of allergic airway inflammation in mice. **Thorax**, v.69,p. 565-573,2014.

CAMPOS-NETO, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Infect Immun**, v.70:2828–2836, 2002.

CAMPOS-NETO, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Infect. Immun**, v.70, 2828-2836, 2002.

CAROSELLI, E.E. et al. *Leishmania (L.) amazonensis* peptidase activities inside the living cells and in their lysates. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.184, p.82– 89, 2012.

CARVALHO, L.H. et al. IL-4-secreting CD4+T cells are crucial to the development of CD8+T-cell responses against malaria liver stages. **Nature Medicine** , v.8, n.2, p.166-170, 2002.

CARVALHO, A.K. et al. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunol.** v.34, p.395-403, 2012.

Center for Disease Control and Prevention. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> acesso em 06 jun 2014.

CHAMPSI, J. et al. Glicoproteína de membrana M-2 protege contra a infecção por *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun.** v.56, p.3272-9, 1988.

CHAPPUIS, F et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.** v5. p.873-82, 2007.

CHIN, C.Y.; TAN, S.C.; NATHAN, S. Immunogenic recombinant *Burkholderia pseudomallei* MprA serine protease elicits protective immunity in mice. **Front Cell Infect Microbiol**, v.2, p.1-9, 2012.

COFFMAN, R.L.; LEBMAN D.A, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Adv Immunol**, v.54, p.229-270, 1993.

DAIFALLA, N.S.; BAYIH, A.G.; GEDAMU, L. Imunogenicidade de *Leishmania donovani* superóxido dismutase ferro B1 e peroxidoxin 4 em camundongos BALB / c: a contribuição dos agonistas dos receptores Toll-like como adjuvante. **Exp Parasitol**. v.129, p.292-298, 2011.

DOBRZANSKI, M.J. et al. Tc1 and Tc2 Effector Cell Therapy Elicit Long-Term Tumor Immunity by Contrasting Mechanisms That Result in Complementary Endogenous Type 1 Antitumor Responses. **The Journal of Immunology**, v.172, p.1380- 1390, 2004.

DONNELLY, J.J.; WARHEN, B.; LIU, M.A. DNA Vaccines: Progress .**The Journal of Immunology**, v.175, p.633-639, 2012.

DUMONTEIL, E. et al. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. **Vaccine**, v.21, 2170–7, 2003.

DUNNING, N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology.**Bioscience Horizons**, v.2, p.73-82, 2009.

EL-ADHAMI, B. Isolation of *Leishmania* from a black rat in the Baghdad area, Iraq. **Am J Trop Med Hyg**, v.25, p.759-761, 1976.

FARBER, L. D.; YUDANIN, A. N.; RESTIFO, P. N. Human memory T cells: generation,compartmentalization andhomeostasis. *Nature Reviews*, v.14, p. 24-35, 2014.

FERREIRA, J.H. et al. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral Leishmaniasis **Vaccine**. v.30, 677-685, 2008.

FUMAGALLI, M.A.C. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. **Microbes and Infection**, v.12, p.967-977, 2010.

GUIMARÃES, L.H. et al., Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. **Gaz. méd. Bahia** p.66-74, 2005.

GAMBOA-LEON, R. et al. Immunotherapy against visceral leishmaniasis with the nucleoside hydrolase-DNA vaccine of *L. donovani*. **Vaccine**.p.24, p.4863–73, 2006.

GANGULY S, et al Increased levels of interleukin-10 and IgG3 are hallmarks of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. **J Infect Dis**. v.197, p.1762-71, .2008.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.229-243, 2001.

HARARI, A. et al. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. **J Exp Med**, v.205, p.63-77, 2008.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H.A. Epidemiological patterns of cutaneous Leishmaniasis in Panama. HI. **Am J Trop Med Hyg**, v.25, p.54-58, 1976.

HUANG, L.R. et al. Potent induction of long-term CD81 T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, p3406-341, 2000.

HUBER M, et al. Effective and longlasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficientmice. **Infect Immun**. v.66, p.3968-70, 1998.

JEONG, Y.J. et al. Vitamin C treatment of mouse bone marrow-derived dendritic cells enhanced CD8 (+) memory T cell production capacity of these cells in vivo. **Immunobiology**, v.219, 554-564, 2014.

JUNIOR, M. J. et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?.**Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.30, p.468-477, 2004.

KEDZIERSKI L, et al. Vaccines for the Leishmaniases: Proposals for a Research Agenda. **Parasitology**. v.133: p.87-112, 2006.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: Where are we today?. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.2, p.177-185, 2010.

KEDZIERSKI L. Leishmaniasis. **Hum Vaccin**. v.7, p.1204–1410, 2011.

KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniases. **Vaccine**, v.23, 3642-48, 2005.

KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. **Indian Journal Medicine Research**, v.123, p.423-438, 2006.

KUTZLER M,A.; WEINER D.B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat Rev Genet**, v.9,p.776-88, 2008.

KRONENBERG, K. et al. Vaccination with TAT-Antigen Fusion Protein Induces Protective, CD8 T Cell-Mediated Immunity Against *Leishmania Major*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.130, p.2602-2610, 2010.

LAURENTI M.D. et al. The role of complement in the early phase of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res*. v.37, p.427-34, 2004.

LEDWITH, B.J. et al. Plamid DNA vaccines: assay for integratiom genomic DNA. **Dev Biol (Basel)**, v.104, p.33-43, 2000.

Li, W. et al.Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 gag DNA vaccination by IL-15 plasmid boosting. *Vaccine*. 2008; 26: 3282-90.

LIEW, F.Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFNgamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J Immunol**, v.145, p.4306-4310, 1990.

LONGONI, S.S. et al. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous Leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 2011.

LONGONI, S.S.; MARÌN, C.; SANCHES-MORENO, M. Excreted *Leishmania peruviana* and *Leishmania amazonensis* iron–superoxidedismutasepurification: Specific antibody detection in Colombian patients with cutaneous Leishmaniasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.69, p.26–34, 2014.

MANAM, S. et al. Plasmid DNA vaccine: Tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. **Intervirolgy**, v.43, p.273-81, 2000.

MARÍN, C.; GONZALEZ, I.G.; SANCHES-MORENO, M. Identification of excreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, p.649-654, 2006.

MAYRINK, W, et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, p.14-21, 2006.

MAYRINK, W. SANTOS, G.C. TOLEDO, V.P. et al. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, p.125-132, 2002.

MCKERROW, J.H. et al. Proteases in parasitic diseases. **Annu Rev Pathol**, v.1, p.497-536, 2006.

MENDEZ, S. et al. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose intradermal challenge. **J Immunol**, v.166, 5122–8, 2001.

MENDEZ, S. et al. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose intradermal challenge. **J Immunol**, v.166, p.5122–8, 2001.

MITCHELL, G.F; HANDMAN, E; SPITHILL, T.W. Examination of variables in the vaccination of mice against cutaneous leishmaniasis using living avirulent cloned lines and killed promastigotes of *Leishmania major*. **Int. J.Paraitol**; v.15: p.677-684, 1985.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.58-61, 2010.

MULLER, S. N. et al. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. **The Annual Review of Immunology**, v.31, p.137-161, 2013.

NADIM, A. et al. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**.; v.76, p.377-83, 1983.

NAGILL, R.; SUKHBIR, K. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**. v.11, p.1567-5769, 2011.

NAOUAR, I. et al. Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania* major antigens. **Mediators Inflamm**, 2014.

NASCIMENTEO, E. et al. Protective Immunity of Single and Multi-antigen DNA Vaccines against Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.105-109, 2002.

NASCIMENTO, I.P. et al. BCG na vacinação contra *Leishmania*. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p.122-128, 2009.

NATION, C.S.; DONDI, B.; STRYKER, G.A. Previous exposure to a low infectious dose of *Leishmania* major exacerbates infection with *Leishmania* infantum in the susceptible BALB/c mouse. **Parasitol Res**, v.111, p.1407–1415, 2012.

NELMS, K. et al. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annu. Rev. Immunol**, v.17, p.701-738, 1999.

NOVAIS, F.O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J Immunol**. v.183, p.8088- 98, 2009.

NGURE, P. et al. Immunostimulatory responses to crude extracts of *Warburgia ugandensis* (sprague) subsp *ugandensis* (canellaceae) by Balb/c mice infected with *Leishmania* major. **Pan African Medical Journal**, v.17, v.15, 2014.

OBAR, J.J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8+ T cell differentiation. **Ann N Y Acad Sci**, v.1183, p.251-266, 2010.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous Leishmaniasis. **Human Vaccines**, v.5, p.291-301. 2009.

OLIVEIRA, G.G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral *Leishmaniasis* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.88, p.243-248, 1982.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em : <<http://www.who.int/en/>> Acesso em : 06 jun. 2014.

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

PASSERO, L.F.D. **Avaliação da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania(Vianna) Shawi***. 209f Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental)- Faculdade de Medicina da Univerisade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PASSERO,D. L. F. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania* (Viannia) shawi. **Parasitol Int**, v. 50, p. 159–165, 2010.

PASSOS, V.M. et al. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, p.19-20, 1996.

PETERS, N. SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunol**, v.213, p.159-79, 2006

PINHEIRO, O. P. Leishmaniose Tegumentar Americana:mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, n.8, p. 80-82, 2004.

PINHEIRO, R.O. et al. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. **Vaccine**, v.25, 2716-22, 2007.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p.1816-1820, 2000.

Portal da Saúde disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/18/Guia-de-vigil--ncia-epidemiol--gica-caderno-11.pdf>> acessado em jun de 2014.

RAMOS, I. et al. Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection.**Vaccine**, v.27, p.6695-703, 2009.

RODRIGUES, M.M. et al. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.75, p.443-468, 2003.

ROITT, I. BROSTOFF, J. MALE, D. **Immunology** 6th ed. Mosby, 2001, 479p.

ROSA, D.S. et al. A Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.58, p.121-130, 2010.

RUSSELL, D.G.; ALEXANDER, J. Effective immunization against cutaneous Leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. **J Immunol.**, v.140: p.1274-1279, 1988.

SACKS D, SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol.** v.3, p.1041-47, 2002.

SEDEGAH, M. et al. Protection against Malaria by Immunization with Plasmid DNA Encoding Circumsporozoite Protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p.9866-70, 1994.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Generation of growth arrested *Leishmania* amastigotes: A tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v.32, p. 3895–3901, 2014.

SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS Lett**, v.580, p.2985-2992, 2006.

SHADEN, K. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v.22, p.439-444, 2006.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of Leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.412-423, 2009.

SHAW, J.J. et al. Cutaneous Leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira in Pará State, Brazil. **Ann Parasitol Hum Comp**, v.66, p.243-246, 1991.

SHIVARARE, R. et al. Combination of Liposomal CpG Oligodeoxynucleotide 2006 and Miltefosine Induces Strong Cell-Mediated Immunity during Experimental Visceral Leishmaniasis. **Plos one**, v.9, p.1-12, 2014.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors**, v.5, p.1-10, 2012.

SILVEIRA, F.T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.31: p.423-431, 2009.

SILVEIRA, F.T. et al. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the Fox Cerdocyon thous (L) as a reservoir of Amazonian visceral Leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.76,8 p.30-832, 1982.

SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.v.99, p.239-51, 2004.

SILVERMAN J.M. et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*. v.9, 2008.

STAGER, S. et al. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. **Nat Med**, volume, 9, 1287-1292, 2003.

TIMM, S.L. et al. Isolation of an enriched plasma membrane-subpellicular microtubule fraction of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.75, p.145-55, 1980.

TITUS, R.G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**. v.7, p.545-555, 1985.

TODOLÌ, F. et al. Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.17–23, 2009.

TRAPANI, J.A.; SMYTH, M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nat Rev Immunol**, v.2, 735-747, 2002.

WOLFF, J.A. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**. v.23, p.247,1465-1468, 1990.

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

YANG, X.; YU, X. An introduction to epitope prediction methods and software. **Rev Med Virol**, v.19, 77-96, 2009.

Anexos

ANEXO A – Alinhamento do DNA com as Sequências Otimizadas

Quotation #:
Gene name: **LbrM08_V2.0330**
Customer:
Optimized for expression in: **Mouse**
Gene length: **711**
Optimization region: **13-705**
Analysis conducted by: **Jason Zhou, Ph.D**
Analysis created: **2011-12-30 15:42:32**

QA: James

GenScript
The Biology CRO

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

OptimumGene™ Codon Optimization Analysis

Optimization Parameters

OptimumGene™ algorithm optimizes a variety of parameters that are critical to the efficiency of gene expression, including but not limited to:

- Codon usage bias
- GC content
- CpG dinucleotides content
- mRNA secondary structure
- Cryptic splicing sites
- Premature PolyA sites
- Internal chi sites and ribosomal binding sites
- Negative CpG islands
- RNA instability motif (ARE)
- Repeat sequences (direct repeat, reverse repeat, and Dyad repeat)
- Restriction sites that may interfere with cloning

Additional sequences we propose to improve translational performance:

- (1) To increase the efficiency of translational initiation
 - Kozak sequence
 - Shine-Dalgarno Sequence
- (2) To increase the efficiency of translational termination
 - Stop codon (TGA)

Results *Mouse*

1. Codon usage bias adjustment

2. GC Content Adjustment

3. Restriction Enzymes and CIS-Acting Elements

Restriction Enzymes	Optimized	Original
* Green: filtered sites; Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.		
HindIII(AAGCTT)	1(1)	1(1)
BamHI(GGATCC)	1(706)	1(706)
CIS-Acting Elements	Optimized	Original
Splice(GGTAAAG)	0	0
Splice(GGTGAT)	0	1
PolyA(AATAAA)	0	0
PolyA(ATTAAA)	0	0
Destabilizing(ATTTA)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	0
PolyA(AAAAAAA)	0	0

4. Remove Repeat Sequences

After Optimization

Max Direct Repeat: Size:9 Distance:95 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: None
 Max Dyad Repeat: Size: 9 Tm: 28.8 Start Positions: 150, 377

Before Optimization

Max Direct Repeat: Size:9 Distance:261 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: Size: 9 Tm: 30.5 Start Positions: 364, 4
 Max Dyad Repeat: Size: 9 Tm: 37.3 Start Positions: 90, 389

5. Optimized Sequence (Optimized Sequence Length:711, GC%:51.71)

AAAGCTTGGCCACC

ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACCGTCATGGCTACCGCTGCGGCTCAGCGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
CTCCCTGAACCTCAGTACCCAGCTGAGCTGCGCGAGCTGGAATCTCTTATGCGGACGGCATCAAAACCGTGTTC
AGTCTCGACAGCTCGAGCTGCACTACCAAGCAACATTAAGCATATGTGGATAAGCTGAACTCTCGCGACC
GGTTATGAAGGCAAGCTATCGAGAAATCATCAAGACCAAAAGGAATGGCGCTAATACCGTCTCTTCAAC
CAGCGCAGCGCAGCTTTAAGCATACATCTTTTGGAAATGCTGCTCCAGCGCGAAAGGCAATGCCCAAACT
CTCGAGCGCGCATTCGAAAGCAGTTCGGTCACTGGAGCATTTCAAAGCTCTTTTCAGCGCGCGGTATGAAC
AATTTTGGCAGCGGATGGACATGCTGTGCTCAATCCAAAGCTCGCGAGCTGCTCATCGACAAACCTTCCAAT
GCGCGGTGCTGTGACAGCTGGTATGGCGCAATTTTCACTGCAGATGTCTGGGAGCATGCTACTATAAGGAC
TTTCAAAATAGGACAGCTGATTACTTGAAGAGATCTGGCAGTGTCTCAACTGGGAATCGTGGTCAATGTAT
TCTAGAGCAATTAAGTGA

GGATCC

6. DNA Alignment (Optimized Region)

Optimized	13	ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACCGTCATGGCTACCGCTGCGGCTCAGCGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
Original	13	ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACCGTCATGGCTACCGCTGCGGCTCAGCGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
Optimized	73	CTGTCTATCACTCCCTCGTGAACCTCAGTACCCAGCTGAGCTGCGGCAAGCTCGAATAC
Original	73	CTGAGCTACCAAGCTCGCGGAGCTTCAGTACCCGCGGCAAGCTCGGCAAGCTCGAATAC
Optimized	133	TCTTATGCGGACGGCATCAAAACCGTGTCTAGTGTCTGACAGGTGAGCTGCACTACACC
Original	133	AGCTATGCGGACGGCATCAAGCGGCTCTTCAGCGCGGCAAGTGGAGCTGCCACTACAGC
Optimized	193	AAACACCATTAAGCATATGTGATAAGCTGAATACTCTCGGACCGGTTATGAAGCAAG
Original	193	AAACACCATTAAGCATATGTGATAAGCTGAATACTCTCGGACCGGTTATGAAGCAAG
Optimized	253	CGTATCGAGGAAATCATCAAGACCAAAAGGAATGGCGCTAATACCGTCTCTTCAAC
Original	253	CGCATTCAGGAGATCATTAAGACTACCAAGCAATGCGCGCAACCGCTTCTTCAAC
Optimized	313	CAGCGCGCGCAGCACTTTAAGCATACATCTTTTGGAAATGCTGCTCCAGCGCGAAG
Original	313	CAGCGCTCTCAGCACTTCAACCACTTCTCTCGGAATGCTAGCGCGGCTGGCAAG
Optimized	373	GCAATGCGGAAACCTCTCGAGCGAGCCATTGCAAGCAGTTGCGGTCACTGACGATTTTC
Original	373	GCCATGCGGAAAGCGCTCGAGCGCGCATGCGGAAGCAGTTTGGAAAGCTTGACGACTTC
Optimized	433	AAAGCTCTCTTTTCAGCAGCGCGGTATGAACAAATTTTGGCGGGAAGACATGCTGTGC
Original	433	AAGTCATCTTTTCAGCAGCGCGCATGAACAACTTTGCTCTGCTGAGCGTGGCTCTGC

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Optimized	493	GTCAATCCCAAGACTGGGAGCTGCTCATGACCAACCTCCAAAGCGGGTGTCTGTG
Original	493	GTCAACCCCAAGACGAGAGAACTTTTGATCGATAACAGGCAACCGGGCTGCCAGTG
Optimized	553	ACAGCTGGTATGCCCCCAATTTTCACTGCAGATGCTGGAGCATGCTACTATAGGAC
Original	553	ACTGCTGGCATGCCCCGATCTTCACAGCGAGCTGTGGGAGCACGCTATTACAAAGAC
Optimized	613	TTTGAAAATAGGAGAGCTGATTACCTGAAAGAGATCTGGCAGTGGTCAACTGGGAATAC
Original	613	TTGAGAAACCGCCCCGAGACTATCTGAAGAGATATGGCAGTTGTCAACTGGGACTAC
Optimized	673	GTCCTCAGATGTATTCTAGAGCAATTAACTGA
Original	673	GTCGCCAGATGTACAGTAGGGCTATCAAGTAA

Conclusion

A wide variety of factors regulate and influence gene expression levels, and our OptimumGene™ algorithm takes into consideration as many of them as possible, producing the single gene that can reach the highest possible level of expression.

In this case, the native gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. We changed the codon usage bias in *Mouse* by upgrading the CAI from 0.77 to 0.84. GC content and unfavorable peaks have been optimized to prolong the half-life of the mRNA. The Stem-Loop structures, which impact ribosomal binding and stability of mRNA, were broken. In addition, our optimization process has screened and successfully modified those negative cis-acting sites as listed in the Introduction.

We are honored to deliver the analysis that you requested. We hope that you are pleased with your GenScript OptimumGene™ results.

Supplementary

1. Codon Frequency Table Used: (Primary Host)

TTT 17.1(244935)	TCT 15.9(228046)	TAT 12.2(175198)	TGT 11.1(158573)
TTC 22.3(319002)	TCC 18.1(258787)	TAC 16.5(236579)	TGC 12.1(173509)
TTA 6.5(92974)	TCA 11.6(165371)	TAA 0.6(8861)	TGA 1.2(17004)
TTG 13.3(189840)	TCG 4.3(61116)	TAG 0.5(7491)	TGG 12.4(177261)
CTT 13.2(188236)	CCT 18.3(261478)	CAT 10.2(145279)	CGT 4.7(66962)
CTC 20.3(290198)	CCC 18.4(262874)	CAC 15.2(217261)	CCG 9.5(136330)
CTA 8.0(114707)	CCA 17.1(244064)	CAA 11.4(163794)	CCA 6.6(94626)
CTG 40.0(571592)	CCG 6.3(89477)	CAG 34.0(486041)	CCG 10.3(147905)
ATT 15.6(223528)	ACT 13.6(194120)	AAT 15.5(221760)	ACT 12.3(176056)
ATC 23.2(332072)	ACC 19.2(274588)	AAC 20.7(296083)	ACC 19.5(279098)
ATA 7.2(103441)	ACA 15.9(227958)	AAA 21.3(305128)	ACA 11.4(163062)
ATG 23.1(330431)	ACG 5.8(82653)	AAG 33.7(482643)	ACG 11.7(167166)
GTT 10.7(152706)	GCT 20.1(288132)	GAT 21.1(301359)	GCT 11.5(164971)
GTG 15.7(224465)	GCC 26.4(378142)	GAC 26.6(380355)	GCC 21.9(312846)
GTA 7.4(105532)	GCA 15.8(226309)	GAA 26.5(379216)	GCA 16.9(241435)
GTG 29.1(416428)	GCG 6.6(94463)	GAG 39.4(563999)	GCG 15.4(220474)

2. Protein Alignment (Optimized Region)

Optimized	1	MLRRVGIKTVMATAAVHAGFLSYHGLPELQYPAKLPKLEYETADGIKPVFCARQVELHYT
Original	1	MLRRVGIKTVMATAAVHAGFLSYHGLPELQYPAKLPKLEYETADGIKPVFCARQVELHYT
Optimized	61	KHKAYVDKLTGLTCYEGKPIREIIKTTNGIAANTVLPNAGQHPNHTFFWKLAPGCK
Original	61	KHKAYVDKLTGLTCYEGKPIREIIKTTNGIAANTVLPNAGQHPNHTFFWKLAPGCK
Optimized	121	AMPKPLEAAIAKQPGCVDDPKSEFQQAQNNPQCGWTWLCVNPKTRELLIDNTNAGCPV
Original	121	AMPKPLEAAIAKQPGCVDDPKSEFQQAQNNPQCGWTWLCVNPKTRELLIDNTNAGCPV
Optimized	181	TACMRPIPTADVWEHAYYKDFENRRADYLRINQVNVWRYVAQMYGRAIK*
Original	181	TACMRPIPTADVWEHAYYKDFENRRADYLRINQVNVWRYVAQMYGRAIK*

GenScript
The Biology CRO

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

OptimumGene™ Codon Optimization Analysis

Optimization Parameters

OptimumGene™ algorithm optimizes a variety of parameters that are critical to the efficiency of gene expression, including but not limited to:

- Codon usage bias
- GC content
- CpG dinucleotides content
- mRNA secondary structure
- Cryptic splicing sites
- Premature PolyA sites
- Internal rib entry sites and ribosomal binding sites
- Negative CpG islands
- RNA instability motif (ARE)
- Repeat sequences (direct repeat, reverse repeat, and Dyad repeat)
- Restriction sites that may interfere with cloning

Additional sequences we propose to improve translational performance.

(1) To increase the efficiency of translational initiation

- Kozak sequence
- Shine-Dalgarno Sequence

(2) To increase the efficiency of translational termination

- Stop codon (TGA)

Quotation #:

Gene name: **LbrM34_V2.4000**

Customer:

Optimized for expression in: **Mouse**

Gene length: **1203**

Optimization region: **13-1197**

Analysis conducted by: **Jason Zhou, Ph.D**

Analysis created: **2011-12-30 15:42:44**

QA: James

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, U.S.

Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: gene@genScript.com Web: www.genScript.com

Results *Mouse*

1. Codon usage bias adjustment

2. GC Content Adjustment

3. Restriction Enzymes and CIS-Acting Elements

Restriction Enzymes	Optimized	Original
* Green: filtered sites; Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.		
HindIII(AAGCTT)	1(1)	1(1)
BamHI(GGATCC)	1(1198)	1(1198)
CIS-Acting Elements	Optimized	Original
Splice(GGTAAAG)	0	0
Splice(GGTGAT)	0	0
PolyA(AATAAA)	0	0
PolyA(ATTAAA)	0	0
Destabilizing(ATTTA)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	0
PolyA(AAAAAA)	0	0

4. Remove Repeat Sequences

After Optimization

Max Direct Repeat: Size:10 Distance:103 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: None
 Max Dyad Repeat: Size: 10 Tm: 33.6 Start Positions: 350, 1092

Before Optimization

Max Direct Repeat: Size:11 Distance:710 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: Size: 10 Tm: 39.6 Start Positions: 397, 1118
 Max Dyad Repeat: None

5. Optimized Sequence (Optimized Sequence Length:1203, GC%:55.54)

AAGCTTGGCAAC

ATGTCATTGGGGGGTTCCTGCTCTGCTGGTCTCTACCTCTCTGGTGGCACTGTTTGTGCTCTCTTC
 CATATCATGTCTCTCGATACAGGTCCAGCAGAACCGACTGCTCTACTATCCACAGATCCCGCTGASTCTAGA
 GAAGTCTGGAGGACCTGTGGCTCTGGTATTCATACGAGAACGGGTCTGTGTCTACACAGCTGATAAGGTG
 CGCTCTGGGTTATATGCTGTGGCTGGCCAGCTCTCTGTGGAGAAAGGCTCTAACTGCACTACTCTCCGAC
 GGCATCGGAAGAACCGCTTAATGTCCGAACCTACCTGGAGGAGTGCGGTGGAGGTGGATGGAGCAGAGAC
 CTGACAGATGGAAATTCAGCCGGAGCACTCTGAGTTCAGGCAACCGCAATGCTTCACTGTCTCTGAAATGCT
 AGCTTCTCATGCTGTACTTTCAGGGAAAGCCGGTAATGTGGACATCGACTGCCACTCCACAGGCTTTGGTG
 GCACACCTCAAGTGGCTGTCTGATGATGGGACTACCGAGGTTTGGTCTGAGCGACATGCTGAACAGACAG
 GAACTCTGGAGCTCGAGCCACAGGCTGTCTTGGACTATCTGTGGAGGACCCCGGTGGCTAGAGATCGGATC
 GTGGTCATGGCACTCTCTGGGGGTCCGGTGGATATTCATCTGGCCCTCACCCCAATATGCAAGGAGATG
 TCGCCGCTCATGCTGGAGAACTCTTTTACTTCAATTGGAGACATGGCTTCGGCACTGTCTAGGCAATCTGACT
 AAGCTCCCAAGCAGATGCTCTCTGGCAGCAGGGCTCTTCAATCTATGTAAGCCCTGGCCCTCAGGATC
 AGTTGGAAATCAGCTCAGAACTGACAAAGCTCATGGTCCCTATGCTGTTTCTCTCGGAATGTGGAGCAAAAT
 GTGCCACCGAGCAGATGAGAACCTCTACAGGCTGCAACAAATGTCTGGCGATGGCAACGAGCAAGTCTG
 ACCATCTCTCTCGGGGCTCTCTGGAATTCAGGAGGTAGCCACAAATCTGCCACTCATGCGCGCTATATG
 TCGCCGCTCCAGGATTTCTGACAGAAGTGGAGAAATAGGGGTTCGGCCCTGCAATTTGA

GGATCC

6. DNA Alignment (Optimized Region)

Optimized	13	ATGTCATTGGGGGGTTCCTGCTCTGCTGGTCTCTACCTCTCTGGTGGCACTGTTT
Original	13	ATGACCTTGGGGGCTTCTCTCTCTGGGGACTCTACTGTCTCTGGTGGCCTATTC
Optimized	73	GTGTCCCTCTTTCTCCATAGCATGTCCTTCCGATACAGTCCAGCAGAACCGACTGCTC
Original	73	GTGTGGCTGTTTCTGCACATTATGAGCTTTCGCTACCCGACTCAGCAGAACCGGCTACTC
Optimized	133	TACTATCCACAGATCCCGCTGAGCTAGAGAACTCTGGAGGACCTTGTGGCTCTGGGT
Original	133	TACTACCCACAGATTCCCGCAGAGCCGGAGGTCTGGAGAACCGGTGGCCCTTGGC
Optimized	193	ATTCATACCCAGAACGGGTGTGTGTCAACACAGCTGATAGGTGGCTCTGGGGTTAT
Original	193	ATCCCTTACGGAGCTGTGTGTGTCAACACCGCTGACAAAGTGAGATTTGGGGCTAC
Optimized	253	ATGCTGTGGCTGGCCCAAGCTCTCTGTGGAGAAAGCTCTAACTGCAGTACTCCGAC
Original	253	ATGCTATGGCCAGGCTTCTGTCTCAGTGGAGAGGCGAGCAATTCAGCACCCCGAC
Optimized	313	GCCATCGGAAGAACCGCTTAATGTCCGAACCTACCTGGAGGAGTGCGGGTCCAGGTG
Original	313	GCGATTGGACGCACATCCCGAATGTGGCACTACAGTGGAGGGGTGCTGTGGAGGTG

Quotation #:
Gene name: **LbrM08_V2.0330**
Customer:
Optimized for expression in: **Mouse**
Gene length: **711**
Optimization region: **13-705**
Analysis conducted by: **Jason Zhou, Ph.D**
Analysis created: **2011-12-30 15:42:32**

QA: James

GenScript
The Biology CRO

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

OptimumGene™ Codon Optimization Analysis

Optimization Parameters

OptimumGene™ algorithm optimizes a variety of parameters that are critical to the efficiency of gene expression, including but not limited to:

- Codon usage bias
- GC content
- CpG dinucleotides content
- mRNA secondary structure
- Cryptic splicing sites
- Premature PolyA sites
- Internal rib sites and ribosomal binding sites
- Negative CpG islands
- RNA instability motif (ARE)
- Repeat sequences (direct repeat, reverse repeat, and Dyad repeat)
- Restriction sites that may interfere with cloning

Additional sequences we propose to improve translational performance:

- (1) To increase the efficiency of translational initiation
 - Kozak sequence
 - Shine-Dalgarno Sequence
- (2) To increase the efficiency of translational termination
 - Stop codon (TGA)

Results *Mouse*

1. Codon usage bias adjustment

2. GC Content Adjustment

3. Restriction Enzymes and CIS-Acting Elements

Restriction Enzymes	Optimized	Original
<i>* Green: filtered sites; Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.</i>		
HindIII(AAGCTT)	1(1)	1(1)
BamHI(GGATCC)	1(706)	1(706)

CIS-Acting Elements	Optimized	Original
Splice(GGTAAAG)	0	0
Splice(GGTGAT)	0	1
PolyA(AATAAA)	0	0
PolyA(ATTAAA)	0	0
Destabilizing(ATTTA)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	0
PolyA(AAAAAAA)	0	0

4. Remove Repeat Sequences

After Optimization

Max Direct Repeat: Size:9 Distance:95 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: None
 Max Dyad Repeat: Size: 9 Tm: 28.8 Start Positions: 150, 377

Before Optimization

Max Direct Repeat: Size:9 Distance:261 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: Size: 9 Tm: 30.5 Start Positions: 364, 4
 Max Dyad Repeat: Size: 9 Tm: 37.3 Start Positions: 90, 389

5. Optimized Sequence (Optimized Sequence Length:711, GC%:51.71)

AAAGCTTGGCCACC

ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACGGTCATGGCTACGGCTGCGGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
 CTCCCTGAACCTCAGTACCCAGCTGAGCTGCGCGAGCTCGAATCTCTTATGCGGACGGCATCAAAACCGTGTTC
 AGTCTCGACAGCTCGAGCTGCACTACACCAAGCAACATAAAGCATATGTGGATAAGCTGAATACTCTCGCGACC
 GGTATGAAGGCAAGCTATCGAGGAATCATCAAGACCAAAAGGAATGCGGCTAATACCGTCTCTTCAAC
 CAGGCGAGCGAGCACTTAAACATACATCTTTTGGAAATGCTGCTCCAGCGCGAAAGGCAATGCCCAAACTT
 CTGAGCGCGCCATTGCAAAAGCACTTGGCTCAGTGGAGCATTTCAAAAGCTCTTTTTCAGCGCGCGGTATGAAC
 AATTTTGGCAGCGGATGGACATGGCTGTGGCTCAATCCAAAGACTCGGAGCTGTCTATCGACAAACACTTCCAAT
 GCGGGGTGCTGTGACAGCTGGTATGGCGCAATTTTCACTGCAGATGTCTGGGAGCATGCTACTATAAGGAC
 TTTCAAAATAGGACAGCTGATTACTTGAAGAGATCTGGAGTGTCTCAACTGGGAATAGTGGCTCAGATGTAT
 TCTAGAGCAATTAAGTGA

GGATCC

6. DNA Alignment (Optimized Region)

Optimized	13	ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACGGTCATGGCTACGGCTGCGGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
Original	13	ATGCTCGCGCGGCTCTCAATCAAAACGGTCATGGCTACGGCTGCGGCTCTTTCTGTGCATATCACTCC
Optimized	73	CTGTCTATCACTCCCTCGTGAACCTCAGTACCCAGCTGAGCTGCGCAAGCTCGAATAC
Original	73	CTGAGCTACCAAGCTGCGGAGCTTCAGTACCCGCGCAAGCTGCGCAAGCTCGAATAC
Optimized	133	TCTTATGCGGACGGCATCAAAACCGTGTTCAGTGTCTGACAGGTGAGCTGCACTACACC
Original	133	AGCTATGCGGACGGCATCAAGCGGCTCTTCAGCGCGCAAGCTGAGCTGCACTACACC
Optimized	193	AAACACCATAAAGCATATGTGATAAGCTGAATACTCTCGGACCGGTTATGAAGCAAG
Original	193	AAACACCATAAAGCATATGTGATAAGCTGAATACTCTCGGACCGGTTATGAAGCAAG
Optimized	253	CGTATCGAGGAATCATCAAGACCAAAAGGAATGCGGCTAATACCGTCTCTTCAAC
Original	253	CGCATTCAGGAGATCATTAAGACTACCAAGCAATGCGGCGAAGCAAGCTCTCTTCAAC
Optimized	313	CAGCGCGCGAGCACTTTAAACATACATCTTTTGGAAATGCTGCTCCAGCGCGAAG
Original	313	CAGGCTCTCAGCACTTCAACACACTTCTCTGGAATGCTAGCGCGGCTGCGAAG
Optimized	373	GCAATGCGCAAGCTCTCGAGCGAGCCATTGCAAGCAGTTGCGGTCAGTGGACATTTTC
Original	373	GCCATGCGCAAGCGCTCGAGCGCGCATGCGCAAGCAGTTTGGAGCGTTGACGACTTC
Optimized	433	AAAGCTCTCTTTTCAGCAGCGCGGTATGAACAAATTTTGGCGGGAAGACATGCTGTGC
Original	433	AAGTCATCTTTTCAGCAGCGCGCATGAACAACTTTGCTCTGCTGAGCGGCTCTGCT

Optimized	493	GTCAATCCCAAGACTGGGAGCTGCTCATGACAAACCTCCAAAGGCGGTGTCTGTG
Original	493	GTCAACCCCAAGACGAGAGAACTTTTGATCGATAACAGGCAACGCGGCTGCCAGTG
Optimized	553	ACAGCTGGTATGCCCCAAATTTCACTGCAGATGCTGGAGCATGCTACTATAGGAC
Original	553	ACTGCTGGCATGCCCCGATCTTCACAGCGAGCTGTGGGAGCACGCTATTACAAAGAC
Optimized	613	TTTGAAAATAGGAGAGCTGATTACCTGAAAGAGATCTGGCAGTGTCAACTGGCAATAC
Original	613	TTGAGAAACCGCCCCAGACTATCTGAAGAGATATGCGAGTTGTCAACTGGGACTAC
Optimized	673	GTCCTCAGATGTATTCTAGAGCAATTAACTGA
Original	673	GTCGCCAGATGTACAGTAGGGCTATCAAGTAA

Conclusion

A wide variety of factors regulate and influence gene expression levels, and our OptimumGene™ algorithm takes into consideration as many of them as possible, producing the single gene that can reach the highest possible level of expression.

In this case, the native gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. We changed the codon usage bias in *Mouse* by upgrading the CAI from 0.77 to 0.84. GC content and unfavorable peaks have been optimized to prolong the half-life of the mRNA. The Stem-Loop structures, which impact ribosomal binding and stability of mRNA, were broken. In addition, our optimization process has screened and successfully modified those negative cis-acting sites as listed in the Introduction.

We are honored to deliver the analysis that you requested. We hope that you are pleased with your GenScript OptimumGene™ results.

Supplementary

1. Codon Frequency Table Used: (Primary Host)

TTT 17.1(244935)	TCT 15.9(228046)	TAT 12.2(175198)	TGT 11.1(158573)
TTC 22.3(319002)	TCC 18.1(258787)	TAC 16.5(236579)	TGC 12.1(173509)
TTA 6.5(92974)	TCA 11.6(165371)	TAA 0.6(8861)	TGA 1.2(17004)
TTG 13.3(189840)	TCG 4.3(61116)	TAG 0.5(7491)	TGG 12.4(177261)
CTT 13.2(188236)	CCT 18.3(261478)	CAT 10.2(145279)	CGT 4.7(66962)
CTC 20.3(290198)	CCC 18.4(262874)	CAC 15.2(217261)	CCG 9.5(136330)
CTA 8.0(114707)	CCA 17.1(244064)	CAA 11.4(163794)	CCA 6.6(94626)
CTG 40.0(571592)	CCG 6.3(89477)	CAG 34.0(486041)	CCG 10.3(147905)
ATT 15.6(223528)	ACT 13.6(194120)	AAT 15.5(221760)	AGT 12.3(176056)
ATC 23.2(332072)	ACC 19.2(274588)	AAC 20.7(296083)	AGC 19.5(279098)
ATA 7.2(103441)	ACA 15.9(227958)	AAA 21.3(305128)	ACA 11.4(163062)
ATG 23.1(330431)	ACG 5.8(82653)	AAG 33.7(482643)	ACG 11.7(167166)
GTT 10.7(152706)	GCT 20.1(288132)	GAT 21.1(301359)	GGT 11.5(164971)
GTG 15.7(224465)	GCC 26.4(378142)	GAC 26.6(380355)	GCG 21.9(312846)
GTA 7.4(105532)	GCA 15.8(226309)	GAA 26.5(379216)	GGA 16.9(241435)
GTG 29.1(416428)	GCG 6.6(94463)	GAG 39.4(563999)	GCG 15.4(220474)

2. Protein Alignment (Optimized Region)

Optimized	1	MLRRVGIKTVMATAAVHAGFLSYHGLPELQYPAKLPKLEYETADGIKPVFGARQVELHYT
Original	1	MLRRVGIKTVMATAAVHAGFLSYHGLPELQYPAKLPKLEYETADGIKPVFGARQVELHYT
Optimized	61	KHKAYVDKLTGLTCYEGKPIREIIKTNGIAANTVLPNGAQHPNHTFPWKCLAPCGK
Original	61	KHKAYVDKLTGLTCYEGKPIREIIKTNGIAANTVLPNGAQHPNHTFPWKCLAPCGK
Optimized	121	AMPKPLEAAIAKQPGCVDDPKSEFQQACMNNPGCGWTWLCVNPKTRELLIDNTENAGCPV
Original	121	AMPKPLEAAIAKQPGCVDDPKSEFQQACMNNPGCGWTWLCVNPKTRELLIDNTENAGCPV
Optimized	181	TACMRPIPTADVWEHAYYKDFENERRADYLRINQVNVWRYVAQMYGRAIK*
Original	181	TACMRPIPTADVWEHAYYKDFENERRADYLRINQVNVWRYVAQMYGRAIK*

GenScript
The Biology CRO

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

OptimumGene™ Codon Optimization Analysis

Optimization Parameters

OptimumGene™ algorithm optimizes a variety of parameters that are critical to the efficiency of gene expression, including but not limited to:

- Codon usage bias
- GC content
- CpG dinucleotides content
- mRNA secondary structure
- Cryptic splicing sites
- Premature PolyA sites
- Internal rib entry sites and ribosomal binding sites
- Negative CpG islands
- RNA instability motif (ARE)
- Repeat sequences (direct repeat, reverse repeat, and Dyad repeat)
- Restriction sites that may interfere with cloning

Additional sequences we propose to improve translational performance.

(1) To increase the efficiency of translational initiation

- Kozak sequence
- Shine-Dalgarno Sequence

(2) To increase the efficiency of translational termination

- Stop codon (TGA)

Quotation #:

Gene name: **LbrM34_V2.4000**

Customer:

Optimized for expression in: **Mouse**

Gene length: **1203**

Optimization region: **13-1197**

Analysis conducted by: **Jason Zhou, Ph.D**

Analysis created: **2011-12-30 15:42:44**

QA: James

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, U.S.

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: gene@genScript.com

Web: www.genScript.com

Results *Mouse*

1. Codon usage bias adjustment

2. GC Content Adjustment

3. Restriction Enzymes and CIS-Acting Elements

Restriction Enzymes	Optimized	Original
* Green: filtered sites; Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.		
HindIII(AAGCTT)	1(1)	1(1)
BamHI(GGATCC)	1(1198)	1(1198)
CIS-Acting Elements	Optimized	Original
Splice(GGTAAAG)	0	0
Splice(GGTGAT)	0	0
PolyA(AATAAA)	0	0
PolyA(ATTAAA)	0	0
Destabilizing(ATTTA)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	0
PolyA(AAAAAA)	0	0

4. Remove Repeat Sequences

After Optimization

Max Direct Repeat: Size:10 Distance:103 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: None
 Max Dyad Repeat: Size: 10 Tm: 33.6 Start Positions: 350, 1092

Before Optimization

Max Direct Repeat: Size:11 Distance:710 Frequency:2
 Max Inverted Repeat: Size: 10 Tm: 39.6 Start Positions: 397, 1118
 Max Dyad Repeat: None

5. Optimized Sequence (Optimized Sequence Length:1203, GC%:55.54)

AAGCTTGGCAAC

ATGTCATTGGGGGGTTCCTGCTCTCTGCTGGTCTCTACCTCTCTGCTGGCACTGTTTGTGCTCCTCTTCTC
 CATATCATGTCTCTCGATACAGGTCCAGCAGAACCGACTGCTCTACTATCCACAGATCCCGCTGAGTCTAGA
 GAAGTCTGGAGGACCTGTGGCTCTGGTATTCATACGAGAACGGGTCTGTGTCTACACAGCTGATAAGGTG
 CGCTCTGGGTTATATGCTGTGGCTGGCCAGCTCTCTGTGGAGAAAGGCTCTAACTGCACTACTCTCCGAC
 GGCATCGGAAGAACCGCTTAATGTCCGAACCTACCTGGAGGAGTGCGGTCCGAGGTGGATGGAGCAGGAGAC
 CTGACAGATGCAATTTACGCGGGAGCACTCTGAGTTCAGGCAACCGCAATGCTTCACTGTCTCTGCAATGCTT
 AGCTTCTCATGCTGTACTTTCAAGGAAAGCCGGTAATGTGGACATCGACTGCCACTCCACAGGCTTTGGTG
 GCACACCTCAAGTGGCTGTCTGATGATGGGACTACCGAGGTTTGGTCTGAGCGGATGCTGAAACAGACAG
 GAACTCTGGAGCTCGAGCCACAGGCTGTCTGACTATCTGTGGAGGACCCCGGTGGCTAGAGATCGGATC
 GTGGTCATGGCACTCTCTGGGGGTCCGTGAGTATTCATCTGGCCCTCACCCCAATATGCAAGGAGAGTG
 TCGCCGCTCATGCTGGAGAACTCTTTTACTTCAATTGGAGACATGGCTTCGGCACTGTCTAGGCAATCTGACT
 AAGCTCCCAAGCAGATGCTCTCTGGCAGCAGGGCTCTTCAATCTATGTAAGCCCTGGCCCTCAGGATC
 AGTTGGAAATCAGCTCAGAACTGACAAAGCTCATGGTCCCTATGCTGTTTCTCTCGGAATGTGGAGCAAAAT
 GTGCCACCGAGCAGATGAGAACCTCTACAGGCTGCAACAAATGTCTGGGAGTGGCAACGAGCAAGTCTG
 ACCATCTCTCTCGGGGCTCTCTGGAATTTGAGGAGGTAGGCACAAATCTGGCACTCATGGCCGCTATATG
 TCCGCGCTCCAGAGTTTCTGACAGAAGTGAGAAATAGGGGTCCGCGCTGCAATTTGA

GGATCC

6. DNA Alignment (Optimized Region)

Optimized	13	ATGTCATTGGGGGGTTCCTGCTCTCTGCTGGTCTCTACCTCTCTGCTGGTCCGACTGTTT
Original	13	ATGACCTTGGGGGCTTCTCTCTCTGGGGGACTCTACTGTCTCTGCTGGTCCGCTATTC
Optimized	73	GTGTCCCTCTTTCTCCATAGCATGTCCTTCGATACAGTCCAGCAGAACCGACTGCTC
Original	73	GTGTGGCTGTTTCTGCACATTATGAGCTTTCGCTACCCGACTCAGCAGAACCGGCTACTC
Optimized	133	TACTATCCACAGATCCCGCTGAGCTAGAGAACTCTGGAGGACCTTGTGGCTCTGGGT
Original	133	TACTACCCACAGATTCCCGCAGAGCCGGAGGTCTGGAGAACCGGTGGCCCTTGGC
Optimized	193	ATTCATACCCAGAACGGGTGTGTGTCAACACAGCTGATAGGTGGCTCTGGGGTTAT
Original	193	ATCCCTTACGGAGCTGTGTGTGTCAACACCGCTGACAAAGTGAGATTTGGGGCTAC
Optimized	253	ATGCTGTGGCTGGCCCAAGCTCTCTGTGGAGAAAGCTCTAACTGCAGTACTCCGAC
Original	253	ATGCTATGGCCAGGCTTCTGTCTCAGTGGAGAGGCGAGCAATTCAGCACCCCGAC
Optimized	313	GCCATCGGAAGAACCGCTTAATGTCCGAACCTACCTGGAGGAGTGCGGGTCCAGGTG
Original	313	GCGATTGGAGCCACATCCCGCAATGTGGCACTACAGTGGAGGGGTGCTGTGGAGGTG

Optimized	373	GATGAGCAGGAGACCTGACAGATGGAAATTCAGCCGAGCCTCTCAGTTCAAGCAAC
Original	373	GATGAGCAGGAGACCTTACAGACCGCATCAGCGCGGAGCACCCCTGTCAGCAGCAAC
Optimized	433	CGGAATGCTTCACTGTCTCTGGAATGCTAGCTTGTTCATGCTGTACTTTCAAGGAAAC
Original	433	CGAAACGCCAGCTTATCGAGCGGATGCCAGCTTGTGTATGCTGTACTTTTCATCGAAAC
Optimized	493	GCCGTAATGTGGACATGSACTGCCACTGGCAGAGCTTTGTGGCAACCTGAAGTGC
Original	493	GCCGTAACCTTGGCCATGCGCTGGCTTGTCTCAGGCTTTGTGGCGCATCTGAAGTGC
Optimized	553	GCTGTGATGATGCTGCACTACCGAGGGTTTGTCTCAGCGAGATGGCTGAACAGACACAG
Original	553	GCTGTGATGATGCTGCACTATGCTGTCTTGGGCTTAAGCATGAGCGGAGCAGAGCCAG
Optimized	613	GAAACTCTGGAGCTCGAGCGCAGGCCCTGTCTTGGACTATCTGTGGAAGGACCCCGGCTC
Original	613	GACAAGCTGGAGCTGGATGCCAGGCCCTGCTTGGACTATTTGTGGAAGGACCTCGAGTGC
Optimized	673	CCTAGAGATCGATCGTGTGTCATGGGCACTCTCTCGGGCGTGGCTGAGTATTCATCTGC
Original	673	CCCCGTGATCGTATCGTGTGTCATGGGCACAGGCTCGGTGGCGCTGTTGATGCCACTTG
Optimized	733	GCCGCTCACCGCCATTATGCAAGGAGAGTGTGGCGGTCATGCTGGAACTCTTTTATGT
Original	733	GCTGCCACAGGCACTAGCCCGCTGTGTTTGTGCTGATTTGAGAGAACTGCTTCAGC
Optimized	793	TCAATTGGAGACATGGCTTCCCACTGTCTAGGCCMAATCTGACTAAGCTCCCAAGCAGA
Original	793	TCCATTGGGATATGGCTCTCTGCACTGAGCGGCCMAATCTGAGGAAGTTGCCAAGCCGA
Optimized	853	TGTCTCTCTCTGGCAGCAGGGCTCTTGTATTACTATGTGAAACCCCTGGGCTCAGGATC
Original	853	TGCCCAAGGCTCGCGCGCGGGCTCTTGTATTACTAGTCAAGCCCTTGGCATTCGGATT
Optimized	913	AGTTGGAATTCAGCTCAGAGCTGACAAAGTCATGCTGCCATGCTGTCTCTCTCGGA
Original	913	AGCTGGAAACAGCGCGCAAAAGGTGACGAAGTTATGCTGGGATGCTCTTCTCTCTGCT
Optimized	973	ATGTGGAGCAAAATTTGTGCCACCCGAGCAGATGAAACCTCTACAAGGTTGCCAACAAG
Original	973	ATGTGTGATGAGATAGTGGCACCCAGACAGATCGGACACTATACAAGGCCAGCAAAAG
Optimized	1033	TGCTCTGCGCATGCGCAACGGACGAAGTCTGACCATCTCTCGCGCGCTTCTCTGGAATTT
Original	1033	TGCTGTGGTATGGCAACGGCAGGAGCTCACCATCCGTTGGCTGCGCTTCTCTGAGTTC
Optimized	1093	GAGAGGGGTAGGCACAACTCTGCCACTCATGCCCGCTATATGTCCGCGCTCAGGAG
Original	1093	GAGGAAGGGCGGCACAACTGCGGCTGATGCCCGCTACATGAGCGCTGTGCAGGAA

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Optimized	1153	TTTCTGACAGAGCTGAGAAATAGCGGCTCGCGCGCTGCAATTGA
Original	1153	TTTCTCAGAGAGCTGCGCAACAGTGGAGTGGGGCAGCCATTGA

Conclusion

A wide variety of factors regulate and influence gene expression levels, and our OptimumGene™ algorithm takes into consideration as many of them as possible, producing the single gene that can reach the highest possible level of expression.

In this case, the native gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. We changed the codon usage bias in *Mouse* by upgrading the CAI from 0.74 to 0.83. GC content and unfavorable peaks have been optimized to prolong the half-life of the mRNA. The Stem-Loop structures, which impact ribosomal binding and stability of mRNA, were broken. In addition, our optimization process has screened and successfully modified those negative cis-acting sites as listed in the Introduction.

We are honored to deliver the analysis that you requested. We hope that you are pleased with your GenScript OptimumGene™ results.

Supplementary

1. Codon Frequency Table Used: (Primary Host)

TTT 17.1 (244935)	TCT 15.9 (228046)	TAT 12.2 (175198)	TGT 11.1 (158573)
TTC 22.3 (319002)	TCC 18.1 (258787)	TAC 16.5 (236579)	TGC 12.1 (173509)
TTA 6.5 (92974)	TCA 11.6 (165371)	TAA 0.6 (8861)	TGA 1.2 (17004)
TTG 13.3 (189840)	TCG 4.3 (61116)	TAG 0.5 (7491)	TGG 12.4 (177261)
CTT 13.2 (188236)	CTC 18.3 (261478)	CAT 10.2 (145279)	CGT 4.7 (66962)
CTC 20.3 (290198)	CCC 18.4 (262874)	CAC 15.2 (217261)	CCG 9.5 (136330)
CTA 8.0 (114707)	CCA 17.1 (244064)	CAA 11.4 (163794)	CGA 6.6 (94626)
CTG 40.0 (571592)	CCG 6.3 (89477)	CAG 34.0 (486041)	CCG 10.3 (147905)
ATT 15.6 (223528)	ACT 13.6 (194120)	AAT 15.5 (221760)	AGT 12.3 (176056)
ATC 23.2 (332072)	ACC 19.2 (274588)	AAC 20.7 (296083)	AGC 19.5 (279098)
ATA 7.2 (103441)	ACA 15.9 (227958)	AAA 21.3 (305128)	AGA 11.4 (163062)
ATG 23.1 (330431)	ACG 5.8 (82653)	AAG 33.7 (482643)	AGG 11.7 (167166)
GTT 10.7 (152706)	GCT 20.1 (288132)	GAT 21.1 (301359)	GGT 11.5 (164971)
GTC 15.7 (224465)	GCC 26.4 (378142)	GAC 26.6 (380355)	GCG 21.9 (312846)
GTA 7.4 (105532)	GCA 15.8 (226309)	GAA 26.5 (379216)	GGA 16.9 (241435)
GTG 29.1 (416428)	GCG 6.6 (94463)	GAG 39.4 (563999)	GCG 15.4 (220474)

2. Protein Alignment (Optimized Region)

Optimized	1	MEPGCFLEAGLYLLNLVALFVGLFLHIMSPRYRQQNRLLYYPQIPPREREVCDPVALG
Original	1	MEPGCFLEAGLYLLNLVALFVGLFLHIMSPRYRQQNRLLYYPQIPPREREVCDPVALG
Optimized	61	IPYARRVCYTTADKVLWGYMLMPCPGSEVKEKNCSTPDALGRTEPNVGTTVGCVRVV
Original	61	IPYARRVCYTTADKVLWGYMLMPCPGSEVKEKNCSTPDALGRTEPNVGTTVGCVRVV
Optimized	121	DGAGDUTDGLSAGSTLSEGNRNASLSCMPFVMLYFHCNACNVCHRLPLAQAFVAHLK
Original	121	DGAGDUTDGLSAGSTLSEGNRNASLSCMPFVMLYFHCNACNVCHRLPLAQAFVAHLK
Optimized	181	AVMMVYHRCPLSDDASQTQRTLELDAQACFYLLWKDPRVPRDRIVVMCTSLGCAVSIHL
Original	181	AVMMVYHRCPLSDDASQTQRTLELDAQACFYLLWKDPRVPRDRIVVMCTSLGCAVSIHL
Optimized	241	AAHHYARRVCIVINSPFSGICMAGALERPIITKLACRCPLAACVFDYVYKPLALRI
Original	241	AAHHYARRVCIVINSPFSGICMAGALERPIITKLACRCPLAACVFDYVYKPLALRI

Optimized	301	EWNSAQKVTXVMVPMFLPGCMCDRIVPPSQMRTLYKAATECLRDGNGRLTIPLRRFLSF
Original	301	EWNSAQKVTXVMVPMFLPGCMCDRIVPPSQMRTLYKAATECLRDGNGRLTIPLRRFLSF
Optimized	361	ESGRHNHLPLMPCYMSAVQSEFLTDVNGGSAAI*
Original	361	ESGRHNHLPLMPCYMSAVQSEFLTDVNGGSAAI*

ANEXO B- Aprovação do Comitê de Ética **CIÊNCIA**

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 23 de Julho de 2012, **TOMOU CIÊNCIA** do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 146/12, intitulado: **"Análise de imunogenicidade e proteção gerada pelas vacinas de terceira geração pVAX1-FSD e pVAX1-SP contra a leishmaniose tegumentar americana experimental"** apresentado pelo Departamento de Patologia.

• **Mudança de pesquisador responsável de: Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti para Dr. Luiz Felipe Domingues Passero.**

Pesquisador executante: **Bruno Luiz Soares Campos**

CEP-FMUSP, 23 de Julho de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa