Luiz Felipe Domingues Passero

Avaliação da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania (Viannia) shawi*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Passero, Luiz Felipe Domingues

Avaliação da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania (Viannia) shawi* / Luiz Felipe Domingues Passero. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.*Leishmania* 2.Leishmaniose cutânea 3.Imunização 4.Antígenos
5.Vacinas contra leishmania

USP/FM/DBD-155/11

Dedico este trabalho a minha mãe (em memória), por todos os ensinamentos, carinho, compreensão. Com todo amor, a ti.

Agradecimentos

Um doutorado é a conjunção de uma série de idéias e decisões feitas por um grupo de pessoas. Por esta razão, não tenho palavras para expressar minha gratidão por todos que estiveram presentes durante estes anos todos.

Gostaria de agradecer a orientadora, Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, com a qual apreendi muitas questões éticas, humanitárias e científicas. Além disso, pudemos descobrir, durante estes anos, como se constrói uma amizade que vai além do *status* de orientador e orientado. Sou extremamente grato por confiar à minha pessoa um projeto da magnitude que foi este, objeto da minha tese. “Muito obrigado” não basta para expressar meu sentimento de carinho e agradecimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo P. Corbett por todo apoio e pelo exemplo. Espero que ao passar dos anos, tenha a mesma motivação que o senhor tem pela ciência.

Ao Prof. Dr. Marcos H. Toyama por todo companheirismo destes 7 anos de convivência. Não há palavras suficientes para expressar todo este período, mas se pudesse, caracterizaria como uma confiança harmoniosa. Agradeço também aos alunos do prof, Eduardo, Camila e Simone, obrigado pelo companheirismo.

Com muito carinho a Profa. Dra. Gabriela Santos-Gomes do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa por me receber em seu laboratório, compartilhar seus conhecimentos e por dividir o

espaço de sua sala durante o período de convivência. Também sou grato por sua amizade e bom humor constante. Agradeço especialmente a aluna da Profa. Gabriela, a bióloga Cláudia Marques por me apoiar nos experimentos “infinitos”, por toda sua paciência, carisma e carinho. Também, deste mesmo instituto, gostaria de agradecer o Dr. Marcelo Sousa Silva, bioquímica Karina P. de Sousa e Bióloga Andréia Lança, por terem me recepcionado fantasticamente bem no laboratório e me ensinarem os princípios da clonagem.

Ao Prof. Dr. Esper Georges Kallás por permitir minha entrada no LIM-60 e um “obrigado” especial a Dra. Karina Salmazi de Carvalho e à bióloga Bianca Natali pela grande ajuda com a aquisição de dados no citômetro de fluxo, bem como na análise de dados, o auxílio deste grupo foi essencial para o melhor entendimento da resposta imune induzida pelo antígeno F1.

Ao Prof. Dr. Renato A. Mortara da UNIFESP por abrir as portas de seu laboratório, e em especial à Dra. Diana Bahia por todo auxílio científico na produção da vacina de DNA. Embora tenhamos convivido pouco, este período já foi suficiente para estreitar os laços de confiança e amizade. Meus agradecimentos sinceros a todos os integrantes deste laboratório. Desta mesma instituição, gostaria de agradecer a Profa. Dra. Daniela S. Rosa, pela amizade e carinho constantes, também pela ajuda com alguns reagentes, muito obrigado!

Agradeço a todos os meus queridos companheiros de jornada científica e que me ajudaram arduamente a chegar a importantes resultados. Entre eles destacam-se Alexis de Sá-Mello, Ana Carolina Stocco de Lima, Ana

Kely de Carvalho, Bruna S. Quevedo, Fernanda Franceschini, Fernanda Rodrigues, Joyce Meneses, Juliano Volpi Sacomori, Maria Luiza A. C. Bordon. Amigos, está em ordem alfabética, não quer dizer que gosto mais de uns em relação a outros, vocês terão (e têm) um lugar especial no meu coração, independente do tipo de ajuda, mas pelo simples fato de compartilhar diversos momentos em minha vida. MUITO OBRIGADO!!!

Aos funcionários e amigos do LIM-50, Dra. Cláudia Gomes, Dra. Vânia da Matta, Edson Tadeu, Lia Negrão e Thaise Y. Tomokane. Vocês tiveram um papel importante em minha vida pessoal e científica durante este período. Também gostaria de fazer um agradecimento especial ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira por doar a cepa de *L. (V.) shawi* e principalmente, pelo incentivo constante do uso da cepa neste estudo.

Agradeço por todo carinho que a Dra. Roseli e Bióloga Maria José, da FMUSP me trataram durante estes anos de convivência. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus amigos da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, Cláudio Rossi e Marina Bueno. Vocês são pessoas muito queridas.

Agradeço ao Prof. Dr. Tomasasa Yano do Laboratório de Virulência de Bactérias do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas por me recepcionar em seu laboratório. Também gostaria de agradecer ao Dr. Luciano Moura Martins pelo companheirismo.

Agradeço a Dra. Adriana Paes Lemes por me auxiliar com a aquisição de dados no Espectrômetro de Massas do Sincroton. Sua ajuda foi essencial

para caracterização do antígeno F1.

A minha família, base total da minha vida. Sem ela não teria chegado tão longe. Entre eles destacam-se meus amados pais, Aparecida de Lima Domingues (em memória) e Cláudio Domingos Passero. Às doces avós Malvina Domingues de Lima e Cândida Passero. Meus irmãos companheiros e queridos Gustavo e Guilherme Passero, mesmo um pouco distante gostaria que soubessem que os amo muito. Todos os tios, que são extremamente importantes e presentes (Edson Passero, Nanci Passero, Zilda L. Domingues). A todos os meus primos. A Anselmo A. de Castro, que já faz parte da minha família, por todo companheirismo, amizade e presença de espírito quando foram necessários.

Aos meus amigos da vida, Andrea Angeli, Carlos Tairum, Isabella Bordon, Juliana M. Watanebe, Marília Bueno, Nelson Ramalho, Nuno Santos, Pedro Pacheco, Sabrina Kubo, Vanessa E. Jesus, todos vocês são essenciais.

Por fim, gostaria de agradecer ao Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50 HCFMUSP) do Depto de Patologia da FMUSP e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo (2007/56209-4) e pelo financiamento do projeto (2007/50654-6).

“O interesse na vida não está no que as pessoas fazem, nem em suas relações mútuas, mas principalmente no poder de comunicar-se com uma terceira parte, antagonista, enigmática, ainda que talvez persuasiva, o que alguns chamam de vida em geral...” Virginia Woolf.

Sumário

Listas

Resumo

Summary

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Leishmanioses	1
1.2 – Epidemiologia	6
1.3 – Imunidade na leishmaniose tegumentar	8
1.3.1 – Imunidade inata	8
1.3.2 – Imunidade adquirida na leishmaniose cutânea – o papel dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	13
1.4 - Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar americana	21
1.5 – Imunizações experimentais	25
2 – OBJETIVOS	37
2.1 – Objetivos gerais	37
2.2 – Objetivos específicos	37
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 – Parasitos	39
3.2 - Animais experimentais	40
3.3 – Estudos <i>in vitro</i>	40
3.3.1 - Crescimento de formas promastigotas	40
3.3.2 - Isolamento de macrófagos peritoneais e infecção <i>in vitro</i> com <i>L. (V.) shawi</i>	41
3.3.3 - Quantificação dos níveis de óxido nítrico	42
3.4 - Evolução da infecção de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 causada por <i>L. (V.) shawi</i>	43
3.4.1 - Infecção <i>in vivo</i>	43
3.4.2 - Imunomarcção de formas amastigotas	44
3.4.3 - Produção de antígeno solúvel de formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i> para análise da resposta imune humoral	46
3.4.4 - Avaliação da resposta imune humoral	47
3.5 - Produção de antígenos de <i>L. (V.) shawi</i> para imunizações experimentais	48
3.5.1 – Antígenos secretados/excretados pelas formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i>	48

3.5.2 - Produção dos antígenos solúveis das formas amastigotas (AgAma) e promastigotas (AgPro) de <i>L. (V.) shawi</i>	50
3.5.3 - Purificação de antígenos das formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i> através de HPLC de fase reversa	51
3.6 - Análises bioquímicas e bioinformáticas dos antígenos	52
3.6.1 – Eletroforese	52
3.6.2 - Identificação do antígeno F1 através de espectrometria de massas	53
3.6.3 Análise de predição de ligação dos antígenos a MHC-I e MHC-II	54
3.7 – Imunizações experimentais e desafio	54
3.8 - Análise de imunidade duradoura induzida pelo antígeno F1	55
3.9 - Análise da carga parasitária	55
3.10 - Análise da resposta imune celular	56
3.10.1 Quantificação da expressão de IFN- γ e IL-4	60
3.10.2 – PCR, purificação e clonagem do produto amplificado em vetores plasmídeos	61
3.10.3 - Construção de curvas padrão e PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão gênica	64
3.11 - Análise da resposta imune humoral	66
3.12 - Análise das populações de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD45RB⁺ e CD62L⁺ nos grupos imunizados com o antígeno F1	66
3.13 - Análise estatística	68
4 - RESULTADOS	69
4.1 – Estudos <i>in vitro</i>	69
4.1.1 - Crescimento das formas promastigotas	69
4.1.2 – Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos e produção de nitratos	70
4.2 – Estudos <i>in vivo</i>	72
4.2.1 – Comparação da infectividade das cepas M15789 e M8408 de <i>L. (V.) shawi</i>	72
4.2.2 – Comparação da infectividade e patogenicidade da cepa M15789 em camundongos BALB/c e C57BL/6	74
4.3 – Imunizações experimentais	87
4.3.1 – Imunização com antígeno secretados/excretados pelas formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i>	87
4.3.2 - Imunização com antígeno solúvel das formas amastigotas e promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i>	95

4.3.3 – Análise da proteção induzida pelos antígenos protéicos purificados a partir do antígeno solúvel das formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i>	101
4.3.4 – Análise da proteção duradoura induzida pelo antígeno F1 purificado das formas promastigotas de <i>L. (V.) shawi</i>	126
5 – DISCUSSÃO	138
6 - CONCLUSÃO	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

Listas

LPG – lipofosfoglicano

gp63 – metaloproteinase de 63kDa

C3b – componente 3 do sistema complemento

C3bi - componente 3 inativado do sistema complemento

CR – receptor do complemento

Fn – fibronectina

LPK – proteína quinase de Leishmania

MFR – receptor de manose e fucose

FnR – receptor de fibronectina

FcR – receptor da porção constante de anticorpos

MØ – macrófagos

TGF- β – fator de crescimento tumoral beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

NET – *neutrophil extracellular traps*

CD – *cluster differentiation* (grupamento de diferenciação)

IFN- γ – Interferon gama

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

NK – célula natural killer

Tc – linfócito T CD8⁺ citotóxico

IL – interleucina

APC – célula apresentadora de antígenos

DNA – ácido dextrosiribonucléico

RNA – ácido ribonucléico

BCG – bacilo Calmette-Guérin

PBS – tampão fosfato

NaNO₃ – nitrato de sódio

PBST – tampão fosfato com 0,05% Tween 20

TRIS – tris(hidroximetil)aminometano

HCl – ácido clorídrico

NaCl – cloreto de sódio

EDTA – ácido etilenodiamino tetra acético

ELISA – teste imunoenzimático

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio Na₂CO₃ - carbonato de sódio

KCl – cloreto de potássio

Na₂PO₄ - fosfato de sódio

KH₂PO₄ - Dihidrogenofosfato de potássio

p-NPP – para-nitrofenilfosfato

Ig – imunoglobulina

TMB - 3,3',5,5' tetrametilbenzidina

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

AgAma – antígeno solúvel das formas amastigotas

AgPro – antígeno solúvel das formas promastigotas

Da – Dalton

MM – massa molecular

HPLC – *high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)

TFA – ácido trifluoroacético

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

BSA – albumina bovina

MgCl₂ – cloreto de magnésio

DTT – ditioneitol

dNTP – desoxirribonucleotídeos

PCR – reação em cadeia da polimerase.

Resumo

Passero, LFD. Análise da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania (Viannia) shawi*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011, 186 p.

A espécie *Leishmania (Viannia) shawi* foi caracterizada recentemente pelo grupo de Lainson. Estudos recentes indicam o importante papel médico epidemiológico deste parasito no Brasil. Portanto, os objetivos do presente estudo foram caracterizar o modelo experimental murino desta infecção, purificar antígenos protéicos e avaliar seus graus de proteção após desafio. Para caracterizar o modelo murino de infecção, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram infectados na pata com formas promastigotas e os achados histopatológicos e imunológicos foram avaliados durante a evolução da infecção. Para os estudos de imunização foram utilizados 10 diferentes antígenos: três secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, dois intracelulares solúveis das formas amastigotas (AgAma) e promastigotas (AgPro), e cinco frações protéicas purificadas a partir do antígeno intracelular solúvel das formas promastigotas. Estes antígenos foram utilizados para imunizar camundongos da linhagem BALB/c duas vezes, subcutaneamente no dorso. Após uma semana da última imunização, os animais foram desafiados com formas promastigotas. O desenvolvimento das lesões nos animais foram acompanhadas por seis ou oito semanas pós desafio (PD), quando os animais foram sacrificados para análise da carga parasitária e dos aspectos relacionados às respostas imune celular e humoral. Camundongos da linhagem BALB/c foram altamente susceptíveis à infecção, uma vez que as mudanças histopatológicas e da imunidade humoral foram mais pronunciadas nos camundongos BALB/c que em C57BL/6. Os antígenos secretados/excretados de baixa massa molecular induziram alta taxa de proteção em comparação aos animais não imunizados, já os antígenos secretados/excretados de média massa molecular protegeram intermediariamente os animais, possivelmente pela alta expressão de IFN- γ e IL-4 nos linfócitos T CD8⁺. AgAma e AgPro tiveram uma resposta antagônica nos animais, pois o AgAma suprimiu a produção de IFN- γ e IL-12, contudo houve maior produção de TGF- β , facilitando o aumento do parasitismo na pele e em linfonodos. Apesar da detecção de TGF- β nos animais imunizados com AgPro, houve um balanço entre a produção de citocinas, com a participação de IL-12 e IFN- γ , que levou a um controle do parasitismo em pele. Através da purificação do AgPro foi visto que os antígenos F1 e F5 protegeram os animais da infecção na pele após desafio, e ainda F1 também protegeu os linfonodos destes animais. Os antígenos F3 e F4 levaram a exacerbação das lesões de pele. A identificação, por espectrometria de massa, do antígeno F1 revelou a presença de 67 componentes, sendo que a maioria deles não possui identificação. Ainda, o antígeno F1 protegeu duradouramente os animais associado à estimulação de linfócitos T CD8⁺ de memória, contudo a

presença de baixos números de parasitos pode ser o reflexo da alta produção de IL-10. Estes dados indicam que o antígeno F1 pode representar um importante candidato vacinal contra a Leishmaniose Tegumentar Americana.

Descritores: *Leishmania*; Leishmaniose Cutânea; Imunização; Antígenos; Vacinas contra leishmania.

Summary

Passero, LFD. Analysis of cellular immune response induced by proteic antigens isolated from *Leishmania (Viannia) shawi*. [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2011, 186 p.

Leishmania (Viannia) shawi specie was recently characterized by Lainson group. Currently, studies indicate important medical and epidemiological role of this parasite in Brazil. Therefore, the aims of this study were to characterize the experimental murine model of this infection, purify proteic antigens and evaluate their protection degrees after challenge. To characterize the murine model of infection, BALB/c and C57BL/6 mice were infected in the footpad with promastigote forms, and the histopathological and immunological findings were evaluated during the evolution of infection. For the immunization studies, 10 different antigens were used, as follow: three released/excreted by promastigote forms of *L. (V.) shawi*; two intracellular soluble antigens from amastigote (AgAma) and promastigote forms (AgPro), and 5 proteic fractions purified from soluble intracellular antigens from promastigote forms. These antigens have been used to immunize BALB/c mice twice, subcutaneously in the rump. After 1 week of last immunization, the animals were challenged. The lesion developments in animals were followed during either six or eight weeks post-challenge (PC), when the animals were sacrificed to evaluate the parasite load and aspects of cellular and humoral immune responses. BALB/c mice were the most susceptible to *L. (V.) shawi* infection, since the histopathological and humoral changes were higher in BALB/c than C57BL/6 mice. Secreted/excreted antigens of low molecular mass induced high protection rate compared to non-immunized mice, already mice immunized with secreted/released antigens of medium molecular mass showed mild protection, possibly caused by high expression of IFN- γ and IL-4 by CD8⁺ T lymphocytes. AgAma and AgPro showed antagonistic response in animals, since AgAma suppressed the IFN- γ and IL-12 production, however high level of TGF- β has been detected, allowing the increasing of parasitism in the skin and lymph nodes. In spite of the detection of TGF- β in AgPro-immunized mice, there was a balance in the cytokines production, with the participation of IFN- γ and IL-12, leading to parasite control in skin. Through the purification of AgPro, it was observed a protective effect of F1 and F5 antigens in the skin after challenge; in addition, F1 also protected the lymph nodes of BALB/c mice. Both F3 and F4 antigens exacerbated the skin infection. The identification, by mass spectrometry, revealed that F1 was composed by 67 components, and the majority has not been identified till now. Moreover, F1 induced long-lasting immunity in BALB/c mice, associated to generation of memory CD8⁺ T lymphocytes, however low parasitism could be the reflect of high production of IL-10.

These data indicate which F1 antigen could be an important vaccine candidate against American Tegumentar Leishmaniasis.

Descriptors: *Leishmania*; Cutaneous Leishmaniasis; Immunization; Antigens; leishmania vaccine.

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, família Tripanossomatidae e gênero *Leishmania*. Atualmente, existem cerca de 22 espécies patogênicas identificadas, sendo a maioria capaz de infectar diferentes gêneros de hospedeiros vertebrados, como roedores, marsupiais, edentados, felinos, canídeos e humanos (Herrer & Christensen 1976; El-Adhami 1976; Silveira et al. 1982; Oliveira et al. 1993; Passos et al. 1996). Estes parasitos também podem infectar hospedeiros invertebrados, como os pertencentes à ordem Diptera, família Psycodidae, gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Embora esses sejam classicamente aceitos como vetores das leishmanias, atualmente se reconhecem outros gêneros de invertebrados que podem fazer parte do ciclo biológico, como pulgas e carrapatos (Colombo et al. 2011).

A infecção em hospedeiros vertebrados é iniciada e transmitida através da picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas com as formas promastigotas metacíclicas, que apresentam morfologia fusiforme com a presença de um longo flagelo (Mohiuddin 1952; Wheeler et al. 2011). Durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação da

saliva, que irá modular a resposta imune local, bem como de formas promastigotas na pele do hospedeiro, que então será fagocitada inicialmente por neutrófilos. Estas células serão capazes de eliminar parasitos por uma série de mecanismos leishmanicidas, contudo a sobrevivência de uma população parasitária em seu interior pode levar a uma importante via de escape da resposta imune inata (Chang et al. 1981; Pearson & Steigbigel 1981; Lima et al. 1998), e portanto a persistência parasitária no interior das células hospedeiras finais, os macrófagos (Farah et al. 1975; Moll 1993; Reiner et al. 1987). Quando estas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, macrófagos ou células dendríticas, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo (Figura 1).

Figura 1 – Formas promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* purificadas utilizando gradiente de ficoll (A) e amastigotas de *L. (V.) shawi* (B) no interior de macrófagos peritoneais (Passero, arquivo pessoal).

Esta modificação é necessária para que os parasitos possam se

adaptar ao novo microambiente fagolisossomal (Naderer & McConville 2008). Quando ocorre a fagocitose dos parasitos pelas células dendríticas ou macrófagos, dois importantes fatos podem ocorrer, que é a eliminação dos parasitos ou sua disseminação para órgãos linfóides regionais, onde será iniciada a resposta imunológica, que dirigirá o hospedeiro vertebrado a um pólo de resistência ou susceptibilidade à infecção. Se o vertebrado tiver um perfil imunogenético de susceptibilidade, o curso clínico da doença progredirá, culminando no desenvolvimento da leishmaniose visceral ou cutânea, dependendo da espécie de *Leishmania* que tenha sido inoculada. Quando o inseto vetor saudável realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo também se infectará podendo reiniciar o ciclo das leishmanioses (figura 2).

Figura 2 – Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. 1 – representa o repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados e o início da infecção em humanos; 2 – após infecção, as formas promastigotas são fagocitadas por células apresentadoras de antígenos e se diferenciam em amastigotas, que então se multiplicam ativamente nas células hospedeiras causando a ruptura destas células (4). Após novo repasto em hospedeiro vertebrado, as fêmeas de flebotomos podem ingerir células infectadas (5), que por ação de uma série de enzimas digestivas do inseto serão rompidas liberando as formas amastigotas (6), que novamente se diferenciarão em promastigotas (7), se ligarão à superfície intestinal destes insetos e se multiplicarão (8), e se tornarão capazes de infectar novo hospedeiro vertebrado após novo repasto sanguíneo (9), reiniciando então o ciclo. Adaptado de *Centers for Disease Control*.

A única espécie causadora de leishmaniose visceral no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, ou *L. (L.) infantum* para alguns autores (Carneiro et al. 2011; Oliveira et al. 2011). Ela é considerada uma enfermidade generalizada e crônica, sendo caracterizada classicamente por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade levando à caquexia e

finalmente ao óbito se o paciente não for tratado (Silveira et al. 2010). A doença pode ser considerada espectral, determinando diferentes formas clínicas, que varia de uma forma assintomática até a forma clínica clássica, definida por todas as características relatadas acima.

Por outro lado, a Leishmaniose Cutânea, ou Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, pode ser causada por diferentes espécies, como a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, entre outras. Esta doença é caracterizada pelo comprometimento do tecido cutâneo e secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e dos fatores imunogenéticos do hospedeiro, por lesões no tecido mucocartilaginoso. É considerada uma doença polimorfa devido aos diferentes tipos de lesões que podem se manifestar na pele, sendo a úlcera leishmaniótica, a manifestação mais recorrente, apresentando contornos circulares, bordas salientes e infiltradas, fundo com granulação grosseira e avermelhada e com discreto exsudato. O comprometimento mucoso pode surgir conjuntamente com as lesões cutâneas ou mesmo meses após o desaparecimento dos sinais clínicos, podendo ocorrer perfuração do tecido cartilaginoso do septo nasal ou do palato.

Portanto, no Novo Mundo, a diversidade de espécies existentes gera um amplo espectro clínico encontrado na doença humana e experimental.

1.2 – Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas nos 5 continentes, em 88 países localizados nas regiões tropical e subtropical, sendo a prevalência mundial superior a 12 milhões de casos, e ainda 350 milhões de pessoas encontram-se em situação de risco em contrair a enfermidade. Contudo, a notificação dos casos é obrigatória apenas em 32 países, portanto, há uma alta taxa de sub-notificação (WHO, 2001).

A leishmaniose visceral ocorre em vários países do Velho e Novo Mundos. A doença causada por *L. (L.) donovani* ocorre em regiões da Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão, Paquistão e regiões do leste da China. A doença causada por esta espécie é considerada uma antroponose, pois é transmitida de homem para homem na maioria dos países citados. Em outras localidades, tal como o Sudoeste da Ásia, África e Europa, a doença visceral é causada pela *L. (L.) infantum*, sendo, neste caso, os canídeos os principais reservatórios da doença. No Novo Mundo, a enfermidade ocorre desde a Argentina até o México, sendo a *L. (L.) chagasi* a principal espécie incriminada. Os reservatórios silvestres são as raposas e gambás, além disso, os cães domésticos podem ser considerados como principal fonte para a infecção humana (Moreno e Alvar 2002).

A leishmaniose tegumentar também possui ampla distribuição, ocorrendo em diversos países do Velho e Novo Mundos. Na Europa é encontrada na região da bacia mediterrânica. Na África, ocorre um maior

acúmulo do número de casos no leste e norte, já na Ásia é encontrada principalmente nos países do Oriente Médio, sendo a *L. major* a principal causadora da doença. No Novo Mundo, a LTA tem ampla distribuição, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo que o Chile e Uruguai não possuem ainda registros da doença. Neste contexto, o Brasil representa a área endêmica de maior importância médica, uma vez que apresenta as maiores taxas de notificação da infecção e a doença tem sido detectada em todos os estados brasileiros, sendo associada uma alta taxa de indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi* (Ministério da Saúde, 2007).

As mudanças sócio-econômicas e comportamentais decorrentes do processo de globalização e industrialização no Brasil vêm levando a um amplo desmatamento, o que permite a entrada de operários em regiões de mata, favorecendo, inclusive a colonização de indivíduos em áreas recém urbanizadas. Facilitando, em conjunto, o aumento do número de casos e diminuição do controle da doença. Embora existam algumas medidas profiláticas classicamente aceitas, como o uso de repelentes, telas e mosquiteiros, elas não têm sido úteis para impedir o avanço das leishmanioses visceral e tegumentar, como tem sido demonstrado por meio dos dados epidemiológicos (Sucen, acesso 04/04/2011). Por esta razão, uma vacina contra as leishmanioses seria uma eficaz medida profilática de controle da doença, uma vez que impediria o desenvolvimento da doença em humanos e animais domésticos, e a manteria apenas no ciclo silvestre.

Embora seja uma tarefa árdua devido à ampla diversidade de espécies

e a variabilidade genética entre cepas, alguns estudos em modelos experimentais tem se mostrado interessantes e animadores. Contudo, para se atingir tal objetivo, deve-se ter muito bem padronizados os modelos experimentais com os quais serão iniciados os testes bem como a resposta imunológica que é gerada contra ou a favor do parasito.

1.3 – Imunidade na leishmaniose tegumentar

1.3.1 – Imunidade inata

Durante a infecção causada por parasitos do gênero *Leishmania*, componentes da resposta imune inata participam ativamente na resposta inflamatória local, como os elementos celulares e acelulares da imunidade inata, como o sistema complemento e mediadores pró-inflamatórios, assim como os neutrófilos e células apresentadoras de antígenos. Após o encontro destes componentes com os protozoários ocorre o estímulo de uma resposta específica com a participação de linfócitos e geração de resistência ou susceptibilidade à infecção.

Quando as formas promastigotas são introduzidas na derme através da picada do flebotomíneo, o sistema complemento é ativado pela via clássica, alternativa ou das lectinas (Mosser e Edelson, 1984, Navin et al. 1989, Green et al. 1994, Dominguez & Toraño 1999). Esta ativação pode induzir a morte de parasitos, sobretudo das espécies cutâneas, que são mais sensíveis à lise pelo complemento em comparação com as espécies

que causam doença visceral. Além disto, parasitos não infectivos são altamente sensíveis à ação do complemento em relação a parasitos infectivos, uma vez que os infectivos sofreram uma série de modificações morfofisiológicas, que em conjunto aumenta a virulência do protozoário, que se torna hábil para infectar hospedeiros vertebrados, processo este conhecido como metaciclogênese (Muskus et al. 2002). Durante esse fenômeno, ocorre o espessamento do glicocálice na membrana das formas promastigotas, o qual é basicamente composto por lipofosfoglicano (LPG), bem como ocorre aumento do número da metaloproteinase de 63kDa (gp63), permitindo que os parasitos se tornem mais resistentes a ação do complemento (Talamás-Rohana et al. 1990).

Esta resistência ao complemento é basicamente efetuada através da inativação do fragmento C3b do complemento ocasionada pela ação da gp63, gerando o componente inativo do complemento, o C3bi, capaz de se ligar à superfície das formas promastigotas. Os parasitos então opsonizados pelo C3bi, são capazes de se ligar aos receptores de complemento, como o CR1 e/ou CR3, presente em células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos (Figura 1).

Figura 3 – A ilustração esquematiza a interação entre as formas promastigotas e macrófagos (MØ). Diferentes moléculas superficiais dos parasitos como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloproteinase de 63kDa (gp63) inativam o componente C3b do complemento e se ligam ao componente C3bi do complemento, que então facilita a adesão e entrada das promastigotas em macrófagos através de sua ligação aos receptores de complemento 1 e 3 (CR1 e CR3). Outros receptores macrofágicos também podem se ligar às formas promastigotas, como os receptores de fibronectina (FnR) e de manose fucose (MFR).

A inativação do sistema complemento pode causar um interessante fenômeno favorável ao parasito, que é a entrada em células hospedeiras sem causar alerta da entrada de patógenos, uma vez que este tipo de fagocitose não induz uma resposta associada à explosão respiratória (Sacks e Sher 2002).

Embora o sistema complemento possa ser utilizado pelo parasito para entrar na célula hospedeira, este componente da imunidade inata também é importante para eliminar alguns parasitos, pois em camundongos BALB/c depletados de complemento, na fase inicial de infecção por *L. (L.)*

amazonensis, se constatou uma menor resposta inflamatória e alto parasitismo, confirmando seu papel protetor e lítico contra as formas promastigotas (Laurenti et al. 2004).

Os neutrófilos também podem desempenhar papéis opostos na infecção causada por *Leishmania*. Fisiologicamente, os neutrófilos possuem um tempo de vida curto, cerca de 6h, mas quando atinge o sítio de infecção na derme eles podem fagocitar as promastigotas, quando isto ocorre os parasitos conseguem inibir a apoptose espontânea, aumentando assim o tempo de vida destas células (Valdés-Reyes et al. 2009). Após cerca de 16 a 18h os neutrófilos infectados iniciam o processo de apoptose tardia, e neste mesmo período os macrófagos chegam ao sítio da infecção e acabam fagocitando os neutrófilos apoptóticos através do reconhecimento de fosfatidil serina na superfície dos neutrófilos. Este tipo de fagocitose não induz uma explosão respiratória, favorecendo, desta forma a entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos (Brandonisio et al. 2000).

A permanência destes parasitos nas células hospedeiras finais também pode ser facilitada pelos neutrófilos, conforme demonstrado por Afonso et al (2008), os quais demonstraram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos infectados *in vitro* com *L. amazonensis* gerou uma resposta anti-inflamatória, dominada pelo fator de crescimento tumoral (TGF)- β e prostaglandina E_2 , favorecendo assim a exacerbação da infecção em comparação aos neutrófilos normais. Por outro lado, a interação dos macrófagos humanos infectados com neutrófilos necróticos levou a uma resposta pró-inflamatória, com alta produção do fator de necrose tumoral

(TNF- α) e superóxido

Embora exista uma via facilitadora da infecção, nem todo neutrófilo será permissivo a infecção. Estudos com cepas do Novo Mundo demonstraram que os neutrófilos podem gerar uma resposta protetora, pois sua depleção em camundongos BALB/c no momento da infecção com *L. (V.) braziliensis* manteve a infecção associada a uma resposta imunológica mista, porém os animais depletados que foram inoculados com parasitos e neutrófilos tiveram um melhor prognóstico clínico (Novais et al. 2009). Apesar dos mecanismos antimicrobianos clássicos dos neutrófilos, atualmente se reconhece o importante papel desempenhado pelas armadilhas extracelulares neutrofílicas (do inglês *neutrophil extracellular traps* – NET), que pode ser definida como uma rede composta basicamente por cromatina e proteínas granulares, que tem como função capturar e imobilizar microorganismos no local da infecção (Brinkmann et al. 2004, Urban et al. 2006, Fuchs et al. 2007). Estas NET's são liberadas dos neutrófilos após morte celular, processo conhecido como Netose. As NET's liberadas por neutrófilos humanos foram capazes de eliminar formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Guimarães-Costa et al. 2009) e também há evidências experimentais que a presença das NET's em cultura de macrófagos infectados leva à produção de TNF- α , ativação macrofágica e conseqüente eliminação de parasitos (de Souza et al. 2010).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra diversos tipos de infecção, mas também pode facilitar a infecção por *Leishmania* sp. em alguns modelos experimentais. Possivelmente, a imunidade inata tem um

importante papel na contenção inicial do número de parasitos no hospedeiro, favorecendo assim uma progressão mais lenta da infecção, deixando para a imunidade adquirida a responsabilidade de eliminar a infecção instalada.

1.3.2 – Imunidade adquirida na leishmaniose cutânea – o papel dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Uma grande parte do conhecimento sobre imunidade na leishmaniose foi adquirido a partir do modelo experimental da *L. major*, no qual é classicamente reconhecido que os camundongos BALB/c são susceptíveis a infecção, uma vez que não controlam a multiplicação parasitária devido a uma forte resposta Th2 desenvolvida. Por outro lado, os camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção, pois são capazes de conter a progressão parasitária e produzir citocinas do perfil Th1, que levará os macrófagos a um estado leishmanicida. Ou seja, os estudos clássicos demonstraram que tanto a resistência quanto a susceptibilidade era desempenhada por linfócitos T CD4⁺.

Logo após a descrição das subpopulações Th1 e Th2 murinas (Mossman & Coffman 1989), foi visto que os camundongos BALB/c infectados por *L. major* possuíam transcritos codificadores de IL-4 nas células de linfonodos de drenagem, porém os camundongos C57BL/6 expressavam primordialmente os transcritos do IFN- γ (Locksley et al. 1987), sendo a resistência transmitida por clones de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ a camundongos naïve, enquanto a susceptibilidade era transmitida a

animais experimentais através da transferência de clones de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4. Estes dados enfatizaram a existência de uma resposta dicotômica na leishmaniose, visto que o IFN- γ pode modificar alguns parâmetros da imunidade inata e adquirida, uma vez que em macrófagos, esta citocina pode induzir a produção de uma série de compostos antimicrobianos, como o óxido nítrico, e aumentar a expressão de moléculas de MHC (Strehl et al. 2005), facilitando em conjunto a eliminação do agente infeccioso, bem como uma maior apresentação de antígenos aos linfócitos. Esta citocina também pode favorecer a diferenciação e proliferação dos linfócitos T (Whitmire et al. 2005), auxiliando a amplificação da resposta imune e eliminação de patógenos intracelulares, como vírus, bactérias e protozoários (Badovinac et al. 2000). Por outro lado, a IL-4 é considerada uma supressora dos linfócitos Th1 produtores de IFN- γ e mediadora da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ Th2. Esta citocina também apresenta um importante papel na diferenciação e geração de linfócitos B de memória. Além disso, ela pode prolongar a sobrevivência de linfócitos T e B (Nelms et al. 1999).

Embora importantes avanços tenham sido efetuados a partir do conceito que IFN- γ teria um efeito protetor e que IL-4 não, uma série de experimentos demonstraram que outros fatores derivados dos linfócitos T CD4⁺ também eram importantes na questão da susceptibilidade e resistência na leishmaniose cutânea, uma vez que camundongos BALB/c que não produziam IL-4 ou seu receptor, devido a uma deficiência genética, eram parcialmente susceptíveis a infecção (Noben-Trauth et al. 1996; Noben-

Trauth et al. 1999), assim como animais tratados com IFN- γ não foram capazes de apresentar cura.

Nestes casos citados acima, a cura não foi obtida devido a um desequilíbrio entre a produção de citocinas indutoras da resposta Th1 e efectoras. Uma das principais citocinas indutoras da resposta Th1 é a IL-12, que é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (Ruhland e Kima 2009). Primariamente, suas funções se correlacionam ao aumento na produção de IFN- γ , à proliferação e atividade citolítica de linfócitos T e células natural killer (Kobayashi et al. 1989; Wolf et al. 1991; Schoenhaut et al. 1992). Nas leishmanioses, o maior interesse relacionado a IL-12 é a sua capacidade de promover o desenvolvimento de respostas Th1. E em fato, a administração de IL-12 nas fases recentes de infecção pôde direcionar a resposta imune em camundongos BALB/c infectados com *L. major* a um pólo de resistência parcial, pois manteve constantes os níveis de IFN- γ durante a evolução experimental da doença, e a resistência gerada preveniu a exacerbação das lesões de pele ocasionada por re-inoculação de parasitos infectivos (Heinzel et al. 1993; Sypek et al. 1993). Portanto, estes relatos indicam que o fenótipo resistente, direcionado pela IL-12, deve ser expresso em fases recentes da infecção para que exista uma amplificação da resposta imune, assim como da subpopulação Th1 de linfócitos T CD4⁺, para que a eliminação parasitária ocorra. Em adição, a constante produção desta citocina auxilia na manutenção de linfócitos de memória produtores de IFN- γ (Pakpour et al. 2008), objetivando extinguir a infecção.

Alguns estudos *in vitro* também demonstraram que a ação na ativação

macrofágica, e conseqüentemente leishmanicida, do IFN- γ poderia ser amplificada na presença do TNF- α (Liew et al. 1990a; Bogdan et al. 1990), indicando que ambas as citocinas desempenham funções complementares na eliminação de parasitos intracelulares. Estudos *in vivo* também comprovaram a importância desta citocina na eliminação de parasitos, pois camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados após seis dias com TNF- α recombinante, puderam diminuir suas lesões e cargas parasitárias, sendo esta resposta associada a ativação macrofágica. Contrariamente, a administração de anticorpos anti-TNF- α a estes animais favoreceram a progressão da lesão e da carga parasitária nos animais infectados e tratados com o TNF- α recombinante (Liew et al. 1990b).

Embora muitos destes estudos tenham conseguido atingir um importante grau de proteção e amenização dos sinais clínicos da doença cutânea e visceral, a persistência de baixos números de parasitos continuou representando um desafio para ser superado (Murray 1990). Estes parasitos residuais no sítio da infecção pode se associar a um efeito direto da presença de IL-10, pois esta citocina tem propriedades antiinflamatórias, sendo capaz de suprimir as funções de células dendríticas e reduzir a capacidade responsiva de macrófagos mediante sinais de ativação (Moore et al 2001). Belkaid e colaboradores (2002) demonstraram que a persistência de parasitos é o reflexo da acumulação de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, uma população de células regulatórias produtoras de IL-10, que é capaz de suprimir a atividade leishmanicida de linfócitos T CD4⁺ efetores. Aparentemente, esta interação entre poucas células infectadas, linfócitos

efetores e células regulatórias permite a geração de uma imunidade duradoura e resistente contra re-infecções, pois a constante imunoestimulação gerada por antígenos parasitários pode levar a geração de memória imunológica e manutenção da proteção. Contudo se houver um desequilíbrio entre estas populações pode haver a reativação da doença (Bogdan 2008). Ainda tem sido observado que em lesões crônicas onde os linfócitos Th1 produzem elevados níveis de IFN- γ , estes também podem se autoregular através da produção autócrina de IL-10. Além disso, a transferência passiva desta subpopulação linfocitária a camundongos BALB/c saudáveis levou a uma exacerbação da infecção causada por *L. major* com altos níveis de IL-4 e IL-10 (Anderson et al. 2007), podendo ser este um importante mecanismo de patogenia parasitária ou mesmo um processo fisiológico para evitar injúrias imunopatológicas gerada por excessiva resposta inflamatória (O'Garra & Vieira 2007).

Outras populações celulares também parecem desempenhar importantes papéis associados à resistência e susceptibilidade na leishmaniose. Neste caso, uma das mais importantes neste contexto, são os linfócitos T CD8⁺. Atualmente, são reconhecidas duas subpopulações efetoras de linfócitos T CD8⁺, que são distinguidas pelo padrão de citocinas que produzem após encontro com antígeno. Os linfócitos T CD8⁺ citolíticos 1 (Tc1) predominantemente produzem IFN- γ e TNF- α , e são capazes de eliminar células alvo por meio de perforina ou mecanismos associados a Fas e Fas ligante. Os Tc2 produzem principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 e destroem células alvos através da via das perforinas. Embora ambas sejam

citotóxicas, uma parte desta população também pode auxiliar na patogênese da doença, produzindo citocinas inibitórias da resposta Th1, ou mesmo alterando a responsividade de células hospedeiras às citocinas Th1, possivelmente pelo fato de adquirirem um fenótipo regulatório (Acapezzato et al 2004).

Para avaliar a função desta população em infecções experimentais causadas por *L. major*, Erb e colaboradores (1996) infectaram camundongos deficientes na molécula de MHC-II, ou seja, as células apresentadoras de antígenos não eram capazes de apresentar antígenos a linfócitos T CD4⁺, mas apenas aos linfócitos T CD8⁺. Neste caso, foi visto que o desenvolvimento da lesão nos animais deficientes era muito mais lento que nos camundongos BALB/c, sendo que os deficientes produziam menos IFN- γ , IL-4 e IL-10, sugerindo que os menores níveis de citocinas eram responsáveis pelo atraso das lesões do que pela presença dos linfócitos T CD8⁺ no sítio da infecção. A ausência da molécula CD8a nos linfócitos T também não alterou o curso da infecção nos camundongos da linhagem C57BL/6, indicando que as células CD8 não eram essenciais para conter a infecção em modelo de resistência (Huber et al. 1998).

Contudo, estas células têm um papel secundário na resistência à *L. major* em algumas situações experimentais. Neste contexto, foi visto que camundongos C57BL/6 infectados com baixo número de *L. major* apresentavam acúmulo de linfócitos T CD8⁺ no sítio da lesão, associado à baixa carga parasitária, e o uso de anticorpos monoclonais anti-CD8a para depletar esta população nos animais infectados agravou as lesões e

promoveu a diminuição dos níveis de IFN- γ , aumentando sua susceptibilidade à infecção, possivelmente pelo fato de que neste modelo de infecção tais linfócitos possam regular a produção de citocinas Th2 (Uzonna et al. 2004).

Alguns protocolos de imunização também demonstraram a importância destes linfócitos na geração da resistência, pois camundongos BALB/c e C57BL/6 vacinados com formulação contendo antígeno total, proteínas recombinantes e adjuvante puderam controlar a infecção, além disto, a proteção duradoura foi dependente de linfócitos T CD8⁺, uma vez que a depleção destas células nos animais imunizados se associou a falência da proteção mediada pela vacina experimental (Rhee et al. 2002). Embora o papel funcional secundário dos linfócitos T CD8⁺ em modelo murino de infecção seja importante, Gaafar et al. (1999) demonstraram que em humanos havia altas densidades destas células infiltrantes na lesão no momento do diagnóstico, e conforme houve regressão espontânea destas lesões, o número dos linfócitos também regrediu, indicando um importante papel na contenção de lesões primárias em infecções naturais por *L. major*. Portanto, estas células podem ter um papel funcional importante sob algumas condições, sendo que sua presença ou funcionalidade no sítio de infecção pode variar nas infecções naturais e experimentais dependendo da espécie de parasito, tipo de hospedeiro e dose de parasitos inoculados. A figura 4 esquematiza a ação da imunidade nas leishmanioses.

Figura 4 – A figura esquematiza a resposta imune direcionada à resistência e susceptibilidade nas leishmanioses. Após infecção, se as células apresentadoras de antígenos (APC) expressarem tais antígenos via MHC-II com produção de IL-12 será estimulada a resposta de linfócitos T $CD4^+$ Th1 e células natural killer (NK), com eliminação de parasitos. Se houver apresentação de antígenos através do MHC-I, ocorrerá a estimulação dos linfócitos T $CD8^+$ 1 ou 2. Por outro lado, se houver apresentação de antígenos através do MHC-II com produção de IL-4, poderá ser estimulada a diferenciação e proliferação de linfócitos T $CD4^+$ Th2 e geração de susceptibilidade à infecção. Ambas as respostas de resistência e susceptibilidades podem ser bloqueadas pela presença de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , facilitando a persistência parasitária e manutenção da doença.

1.4 - Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar americana

Os modelos experimentais desempenham importantes papéis no estudo da leishmaniose, uma vez que uma série de importantes descobertas sobre os mecanismos imunopatológicos foi evidenciada através do uso de animais. Neste contexto, os camundongos, se tornam extremamente interessantes, uma vez que podem ser isogênicos e, portanto, possuem uma fisiologia muito bem definida, e principalmente porque podem mimetizar uma série de aspectos da doença humana, variando de resistência até susceptibilidade à infecção.

Neste contexto, uma das mais importantes espécies causadoras de doença no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, e uma série de modelos experimentais de infecção já foi avaliada. Em hamsters infectados com esta espécie foi visto que houve similaridade com lesões humanas, pois nas fases iniciais de infecção era observado um infiltrado inflamatório associado a áreas de necroses com parasitismo moderado, já nas fases tardias eram observados granulomas definidos e deposição de colágeno com baixa carga parasitária (Sinagra et al. 1997). Outros modelos também demonstraram ser úteis para estudar as alterações histopatológicas causadas por este parasito, como o rato *Myiostomys albicaudatus*, cujas características histopatológicas estiveram associadas à presença de infiltrado inflamatório difuso pela pele, contendo granulomas organizados e macrófagos parasitados. Neste modelo experimental foi possível detectar um infiltrado inflamatório discreto composto por linfócitos até 12 meses após infecção inicial (McKinney &

Hendricks, 1980). Porém foi verificada a relativa resistência de camundongos BALB/c a este parasito, a qual pôde ser eliminada quando a saliva do vetor foi co-inoculada com as promastigotas ou quando houve o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias (Donnelly et al. 1998). Além disso, foi visto que o sítio da infecção experimental é extremamente importante para induzir o perfil final de infecção (Osorio et al. 2003). Neste sentido, de Moura e colaboradores (1998) caracterizam um modelo experimental, onde os camundongos da linhagem BALB/c apresentaram ulceração na derme da orelha, com a presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por células mononucleares, polimorfonucleares e parasitos viáveis. As altas freqüências de linfócitos produtores de IFN- γ devem ter facilitado a regressão total da lesão após 10 semanas após a infecção. Possivelmente, os níveis aumentados de IL-12 neste tipo de infecção devem facilitar a produção de IFN- γ , tanto pelas células natural killer (NK) quanto por linfócitos T, ativando as células efectoras e gerando esta resistência (Howard et al. 1982). Alguns estudos funcionais demonstraram que camundongos BALB/c deficientes na produção de IL-12p40 se tornavam mais sensíveis à infecção que os selvagens (Souza-Neto et al. 2004), mas a infecção dos animais deficientes na produção da molécula biologicamente ativa, a IL-12p70, foi maior com comprometimento visceral (Rocha et al. 2007). Possivelmente, a resistência dos camundongos à infecção por *L. (V.) braziliensis* se correlaciona a uma maior produção da citocina pró-inflamatória, IL-12, e portanto à estimulação da produção de IFN- γ e ativação de células infectadas a um estado leishmanicida.

Em um pólo oposto dos modelos murinos de infecção, encontra-se a *L. (L.) amazonensis*. Uma ampla diversidade de trabalhos tem sido realizada com esta espécie, em parte porque os parasitos são facilmente cultiváveis e também porque é responsável por gerar a forma anérgica difusa de leishmaniose tegumentar em humanos. Em praticamente todo modelo murino, este parasito pode causar patologia. Andrade e colaboradores (1984) demonstraram que os camundongos BALB/c infectados apresentaram um grande tamanho de lesão, associado a uma depressão da resposta tardia de hipersensibilidade a antígenos do parasito e metástases de lesões, uma vez que foram encontrados parasitos até em medula óssea. Por outro lado, os camundongos da linhagem A/J apresentaram menor tamanho de lesão, reação de hipersensibilidade tardia positiva com a presença de parasitos com aspectos degenerados. Posteriormente, foi demonstrado que poderiam ocorrer metástases de *L. (L.) amazonensis* para o baço e fígado, além da destruição óssea nos camundongos BALB/c, contudo os camundongos DBA-2 desenvolveram uma lesão apenas confinada ao sítio de inoculação primária (Abreu-Silva et al. 2004). Do ponto de vista imunológico, estes animais também podem desenvolver respostas totalmente diversas em comparação aos animais experimentalmente infectados com *L. (V.) braziliensis*. Em camundongos C56BL/10 foi visto que o parasito suprime a produção de IFN- γ e aumenta a de IL-4 em fases mais recentes de infecção, que por sua vez induz um curso de infecção maior e mais agressivo quando comparado aos animais infectados com *L. major*, mas quando é feito um tratamento com anti-IL-4 há uma grande redução da

carga parasitária com aumento dos níveis de IFN- γ (Afonso & Scott 1993), apontando ao fato de que a IL-4 é uma importante citocina associada à patologia. Mas aparentemente nas infecções por *L. (L.) amazonensis*, a IL-10 não possui um papel tão importante quanto apresenta nas infecções por *L. major*, pois os camundongos BALB/c com deficiência genética em IL-10 não apresentaram cura espontânea, apenas uma pequena diminuição do tamanho da lesão, sendo requerido um tratamento adicional com anti-IL-4 para conseguir resolução da lesão nos animais com a deficiência (Padigel et al. 2003).

Possivelmente, a *L. (V.) shawi* ocupe, experimentalmente, um pólo intermediário entre as infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Este parasito foi descrito por Lainson e colaboradores em 1989; sendo isolado de macacos (*Cepus apella* e *Chiropotes satanas*), preguiças (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e do vetor *Lutzomyia whitmani*. Na maioria destes animais silvestres, foi possível isolar o parasito apenas da pele, exceto nos bicho preguiças, onde o parasito pôde ser encontrado no baço e fígado, possivelmente pelo fato de possuírem temperaturas corpóreas mais baixas, permitindo a visceralização. Experimentalmente, foi possível infectar o hamster *Mesocricetus auratus*, sendo que nestes animais houve a caracterização de um pequeno nódulo ulcerado no sítio dermal da inoculação, com moderado número de formas amastigotas (Lainson et al. 1989). Porém, sua importância médica e epidemiológica foi apenas confirmada em 1991, quando foi demonstrado que diferentes cepas deste parasito induziam diversos padrões de lesões em

humanos, que variava de únicas a múltiplas, bem como de resposta imune celular, uma vez que alguns pacientes apresentavam forte reação positiva para o teste de Montengro, enquanto outros eram negativos, exemplificando a grande diversidade gênica encontrada dentro desta espécie (Shaw et al. 1991). Os mesmos autores afirmaram que eram comuns casos de infecção por este parasito entre o leste de Pará e o Sul do rio Amazonas. Mais recentemente, Brito et al. (2009) analisaram a diversidade genética de parasitos do gênero *Leishmania* encontrada na mata Atlântica na região de Pernambuco, e detectaram que a maioria dos isolados foram caracterizados como *L. (V.) braziliensis*, contudo 5 deles pertenciam a *L. (V.) shawi*, ou seja, este parasito é capaz de se expandir por diferentes regiões do território brasileiro. Por esta razão, estudos experimentais de ordem profiláticas devem ser efetuados, uma vez que há grande escassez de estudos com tal espécie.

1.5 – Imunizações experimentais

O desenvolvimento de um candidato vacinal contra as leishmanioses tegumentares seria um importante passo para eliminar a doença humana, pois de acordo com uma série de autores, esta é uma das medidas profiláticas mais interessantes para eliminação de patógenos (Marsden 1984; Van Voorhis 1990). No caso das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, o desenvolvimento de uma vacina contra a LTA pode ser um pouco mais árduo devido à extensa diversidade de espécies encontradas.

Associado a isto, o fato de que cada espécie poder causar mecanismos imunopatológicos distintos complica ainda mais este cenário. Porém, os resultados que têm sido encontrados em desafios homólogos são estimuladores.

Uma vacina ideal basicamente deveria estimular a resposta Th1 e diminuir um conjunto de fatores imunossupressores. Para isso, o imunógeno deveria estimular a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, que então ativaria populações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ efetores e de memória, produtores de IFN- γ . Quando houvesse o encontro destas células com o antígeno ou patógeno, haveria indução e produção de IFN- γ e óxido nítrico pelas células infectadas, e portanto a destruição do microorganismo. Este quadro imunológico seria o adequado para desenvolver imunidade protetora durante uma infecção.

Nesta tentativa, diversas fontes de antígenos foram avaliadas, como as vacinas vivas (parasitos inteiros virulentos), extrato total de parasitos, antígenos semi-purificados como membranas, antígenos intracelulares e liberados/secretados, proteínas purificadas ou recombinantes e material genético (DNA ou RNA).

As vacinas vivas compreendem basicamente aqueles imunógenos formulados com o parasito vivo virulento, atenuados ou modificado geneticamente. O método de imunização mais antigo e clássico destas vacinas foi nomeado de leishmanização. Este método consistia na inoculação do exsudato de lesões ativas dos indivíduos com leishmaniose cutânea em indivíduos saudáveis, geralmente em regiões menos expostas

do corpo. Tais indivíduos desenvolviam lesões que regrediam espontaneamente, e ainda adquiriam imunidade protetora, tornando-se assim resistentes a futuras infecções (Nadim et al. 1983). De fato, foi demonstrado que indivíduos injetados com um estabilato de formas promastigotas virulentas de *L. major* viáveis e virulentas adquiriam proteção completa após leishmanização, associado ao aumento na resposta de hipersensibilidade tardia e nos níveis de IFN- γ (Khamesipour et al. 2005). Embora se trate de uma interessante técnica, há uma série de problemas envolvendo seu uso, como a manutenção da infectividade das cepas após longo tempo de cultivo (Greenblatt et al. 1980), e digno de nota é que os indivíduos desenvolvem lesão com parasitos viáveis no sítio da inoculação, ou seja, eles podem ser considerados reservatórios em potencial, pois as lesões demoraram, em média 285 dias para regredir completamente (Khamesipour et al. 2005), fato este que limita a utilização deste tipo de abordagem para imunização em regiões endêmicas.

Outra interessante estratégia para imunização é a produção de parasitos “cassetes suicidas”. Estes cassetes nada mais são do que parasitos modificados geneticamente. Com esta manipulação é possível inserir alguns genes no genoma parasitário que por ação de agentes externos produzem metabólitos letais aos protozoários (Muyombwe et al. 1998). A inserção do gene timidina quinase do vírus herpes 1 em *L. major* levou a uma diminuição do tamanho de lesão e da carga parasitária quando camundongos BALB/c infectados com tais parasitos eram tratados com Ganciclovir. Isto porque o transcrito do gene provindo do vírus herpes era

capaz de fosforilar o medicamento Ganciclovir a um produto tóxico, levando a morte de protozoários e evitando a cronificação da lesão, bem como a permanência parasitária no sítio da inoculação inicial. Além disso, os animais submetidos a leishmanização com estes parasitos suicidas quando eram desafiados com parasitos selvagens apresentaram proteção completa (Muyombwe et al. 1997). Contudo, até o presente momento nenhum teste em humanos ou primatas foi efetuado, possivelmente pelo fato de que os protozoários modificados geneticamente necessitem de compostos externos, como medicamentos, para serem eliminados, fato este que pode também se associar a geração de outros microorganismos resistentes a fármacos.

Outros candidatos vacinais, como os extratos totais dos parasitos também se mostraram promissores na indução de proteção em animais experimentais e em alguns casos promoviam proteção parcial em humanos. Estes antígenos podem ser enquadrados nas vacinas de primeira geração. No Brasil, em humanos a eficácia dos extratos totais foi testado inicialmente em meados de 1940, utilizando como formulação cinco diferentes espécies de parasitos, e em 1970 a formulação começou a ser composta por apenas uma espécie, a *L. (L.) amazonensis*, contudo a eficácia encontrada foi baixa, cerca de 50% nos ensaios conduzidos (Pessoa et al. 1940; Mayrink et al. 1978; Mayrink et al. 1979; Antunes et al. 1986). Atualmente, esta formulação conjuntamente com BCG é registrada apenas para uso combinado com a quimioterapia em humanos na tentativa de reduzir os efeitos tóxicos e dolorosos do tratamento com antimonial pentavalente, pois de acordo com Mayrink et al. (2006) este método de tratamento reduz significativamente o

tempo de tratamento de indivíduos com leishmaniose cutânea.

Em modelos experimentais, foi visto que vacinas monovalentes constituídas por BCG e extratos totais de *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. guyanensis* também pôde induzir proteção parcial nos camundongos C57BL/10 em cerca de 40 a 50% após desafio com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Estes animais apresentaram uma resposta imune mista, com variáveis níveis de IFN- γ , IL-4 e anticorpos bem como de taxas de linfoproliferações nos animais imunizados, sendo sempre superiores aos dos animais controles (Mayrink et al. 2002). Neste estudo, foi visto que embora a resposta imune possa ser diferenciada nos diferentes grupos imunizados com a vacina monovalente, a proteção induzida pelas diferentes formulações foi similar, indicando a existência de antígenos protetores conservados entre as espécies cutâneas do Novo Mundo. Embora os resultados obtidos sejam interessantes, este tipo de formulação deve ser empregada com certa cautela, uma vez que o extrato total de parasitos é uma mistura complexa de antígenos, contendo membranas celulares, compostos solúveis intracelulares e material genético. Além disso, se reconhece a natureza imunossupressora da resposta Th1 de alguns antígenos, diminuindo a eficácia de antígenos protetores. De qualquer forma, este tipo de método de estudo pode ser útil na descoberta de espécies que possuem antígenos mais protetores, e assim através de estudos bioquímicos se torna possível identificar bons candidatos vacinais definidos.

Estes antígenos definidos também tem se mostrado extremamente interessantes na indução de respostas imunológicas. Estes imunógenos

podem ser classificados como pertencentes a 2ª geração de vacinas. Neste grupo, se englobam antígenos purificados a partir dos extratos totais de parasitos, proteínas recombinantes, antígenos semi-purificados e microorganismos, como vírus e bactérias, carreadores de genes codificadores de antígenos parasitários. Uma gama imensa de resultados foi encontrada com tais tipos de antígenos, variando de proteção a exacerbação de doença. Um dos primeiros trabalhos sobre vacinas experimentais de 2ª geração com as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo data da década de 80 (Timm et al. 1980). Neste trabalho, os autores purificaram frações antigênicas de membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis* e avaliaram sua imunogenicidade em camundongos Swiss. Ficou comprovado que os animais que receberam os imunógenos foram capazes de apresentar hipersensibilidade tardia quando o antígeno total da desta espécie foi injetado subcutaneamente, sendo associado a uma alta taxa de linfoproliferação, contudo análises de proteção não foram analisadas. A partir desta década, uma ampla diversidade de estudos foram realizados (Champsi & McMahon-Pratt, 1988, Kedzierski et al., 2006) com o objetivo de bloquear a entrada das formas promastigotas em suas células hospedeiras através do reconhecimento inicial de componentes de membrana celular. É sabido que as formas promastigotas possuem diversos tipos de glicoconjugados de superfície, contudo suas eficiências nas imunizações experimentais foram discrepantes. Mitchell e Handman (1985) demonstraram que apenas 5 µg de gliconjugados purificados de *L. major* formulado com *Corynebacterium parvum*, como adjuvante foi suficiente para

gerar proteção completa nos camundongos C3H/He, considerados como resistentes à infecção por *L. major*, enquanto que nos BALB/c esta taxa de proteção foi alta, mas nas fases tardias de infecção foi observado um aumento da lesão, embora de tamanho inferior aos animais apenas infectados. Por outro lado, os glicoconjugados de *L. (L.) amazonensis* não foram bons antígenos protetores, pois camundongos BALB/c que receberam o imunógeno apresentaram supressão da resposta imunológica, associado a uma exacerbação da infecção causada por *L. (L.) amazonensis* (Rodrigues et al., 1987). Mas a imunização intranasal com um glicoconjugado bem definido, o LPG de *L. (L.) amazonensis* levou a um aumento da resposta imune celular e diminuição da carga parasitária na pele e nos gânglios linfáticos (Pinheiro et al., 2007). Na membrana de parasitos infectivos, há um grande número de moléculas de gp63, e como ela é distribuída e bem conservada no gênero *Leishmania*, diversos trabalhos tentaram estudar suas propriedades imunogênicas. Camundongos BALB/c e CBA/Ca imunizados com gp63 de *L. (L.) mexicana* encapsuladas em lipossomos apresentaram alta taxa de proteção, associada a resposta benéfica de linfócitos T, pois sua transferência a camundongos saudáveis também induziram proteção após desafio (Russel & Alexander, 1988). Além disso, a imunização de camundongos BALB/c com bactérias que expressavam a gp63 levou a uma ativação da resposta celular, associada a alta produção de IL-2 e baixa de IL-4, e também pela ativação de células T citotóxicas, com capacidade de eliminar células tumorais. Em conjunto, este perfil imunológico se associou a um aumento da proteção contra *L. (L.) mexicana* (González et al., 1998),

porém, até o momento, nenhum estudo demonstrou que os animais experimentais tiveram proteção suficiente para que pudesse ser formulada uma vacina eficiente contra leishmaniose a partir da gp63.

Outro interessante candidato vacinal de 2ª geração são os antígenos secretados ou excretados pelo parasito. Um dos primeiros estudos demonstrando seu potencial foi realizado por Scott e colaboradores (1990), que demonstraram que as moléculas secretadas/excretadas pelas formas promastigotas de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* possuíam antigenicidade e induziam proteção contra estes parasitos, associado à produção de IFN- γ pelas células efectoras. Posteriormente, foi visto que este grupo de antígenos puderam modular a resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ na leishmaniose visceral experimental murina, conferindo resistência aos camundongos BALB/c e C57BL/6 (Rosa et al., 2006), e também na leishmaniose visceral canina, pois os cães imunizados com este imunógeno associado ao muramil dipeptídeo apresentaram alta taxa de proteção, com produção de altos níveis de IFN- γ que puderam ativar macrófagos e eliminar parasitos intracelulares. Tal fato evidencia que além dos ensaios experimentais, este tipo de alvo pode ser extremamente interessante para proteger os animais em infecções naturais (Lemesre et al., 2007).

Os antígenos mais protegidos dos parasitos, que são os intracelulares, também se mostraram capazes de gerar proteção a modelos experimentais. Neste sentido, a imunização com cisteíno proteinase purificada de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* conferiu proteção em camundongos BALB/c após desafio homólogo, sendo a proteção ligada a alta produção de

IFN- γ e IL-2 (Beyrodt et al., 1997). Outros trabalhos reforçaram o potencial protetor deste antígeno, pois camundongos BALB/c que foram imunizados apresentaram lesões de pele diminuídas significativamente em relação aos animais não imunizados e maiores níveis de IFN- γ foram observados (Rafati et al., 2000). Em cães imunizados com uma combinação de DNA e cisteína proteinase recombinante foi possível detectar altos níveis de proteção 12 meses após desafio, pois neste período experimental não foi detectado parasitos na medula óssea, e os linfócitos extraídos de sangue periférico expressaram altos níveis de IFN- γ , porém alguns animais imunizados também expressavam IL-10, uma importante citocina relacionada à regulação imunológica. Entretanto, camundongos BALB/c imunizados com apenas a forma recombinante deste imunógeno apresentou baixa taxa protetora, mesmo com elevadas frequências de linfócitos T CD8⁺ em comparação aos T CD4⁺ (Fedeli et al., 2010). Tais trabalhos demonstram que as vacinas de segunda geração podem ser consideradas importantes alvos para o desenvolvimento de novas vacinas efetivas, pois estes imunógenos podem reagir e induzir uma série de eventos imunológicos a favor do hospedeiro vertebrado tanto em infecções experimentais quanto naturais.

As vacinas de terceira geração são aquelas constituídas por material genético do parasito inserido em um vetor, tal como os plasmídeos bacterianos. O conceito de vacinas de DNA surgiu na década de 90 (Wolff et al, 1990), com a expressão de proteínas alvo em miócitos de camundongos como consequência da imunização intramuscular de DNA plasmideal

carreando genes alvos. As vacinas de DNA apresentam algumas vantagens sobre as outras gerações de vacinas, pois seu desenvolvimento é rápido, são relativamente simples para produzir e em comparação com outros métodos de purificação e identificação de antígenos, são mais baratas, estáveis e fáceis de transportar. Outro ponto atrativo para seu desenvolvimento é o fato que em um único carreador (plasmídeo) é possível inserir mais de um alvo antigênico, facilitando, desta forma, a indução da proteção contra mais de uma espécie de agente patogênico. O uso das vacinas de DNA também mostrou ser uma interessante intervenção profilática na leishmaniose cutânea e visceral, pois a inserção do gene da gp63 de *L. major* no plasmídeo pCMV facilitou o controle das lesões de pele em 3 vezes quando comparado aos animais não imunizados, e pôde aumentar a produção de IL-2 e IFN- γ , interessante, os miócitos dos camundongos BALB/c expressavam em sua membrana a gp63, indicando que a constante produção deste antígeno pelos miócitos era responsável pela indução da proteção encontrada (Xu & Liew, 1985), contudo detectada como passageira em estudos subseqüentes (Ahmed et al., 2004). Em modelo de leishmaniose visceral murina, foi visto que a gp63 de *L. donovani* inserida no plasmídeo pcDNA também conferiu proteção aos animais imunizados, associado a diminuição da carga parasitária tanto no fígado quanto no baço e aumento dos níveis de IL-2 e IFN- γ concomitante à diminuição de IL-4 e IL-10. Embora este tipo de estratégia de vacinação seja interessante e promissora, até o momento nenhum candidato tem sido relatado para uso em humanos, possivelmente pelo fato de que relatos

conflitantes tenham sido feitos. Digno de nota é que o mecanismo de ação destas vacinas ainda não está bem esclarecido, o que, em fato pode dificultar o desenvolvimento de uma vacina propriamente dita (Donnelly et al., 2005).

Aparte dos métodos clássicos de vacinação e produção de antígenos, há outros que atualmente tem sido empregados para vacinação. Uma interessante forma de imunizar animais é utilizar células dendríticas como carreadoras de antígenos. Para tanto, estas células são diferenciadas ou purificadas e, em seguida pulsadas com determinado antígeno e então injetadas em animais saudáveis, objetivando proteção. A racionalidade do uso deste método se correlaciona com o fato de que as células dendríticas são uma das mais potentes células apresentadoras de antígenos que podem mediar a resposta de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ por ter uma alta capacidade de migrar aos linfonodos regionais para estimular a resposta imune (Banchereau et al., 2000). Moll e Berberich (2001) verificaram que a incubação de células dendríticas pulsadas com antígeno total de *L. major* induzia produção de IL-12 por tais células, e quando estas eram injetadas em camundongos saudáveis, estes adquiriam proteção duradoura. Posteriormente, foi visto que tal método só era eficaz quando os antígenos eram capazes de produzir IL-12, e de fato, a incubação de células dendríticas com o antígeno LACK pôde aumentar os níveis de expressão de IL-12 e após imunização com tais células houve proteção dos animais desafiados (Berberich et al., 2003). Esta estratégia de vacinação também foi efetuada com *L. (V.) shawi*, entretanto, quando houve a incubação de

antígenos totais de formas promastigotas e antígenos semi purificados com células dendríticas, foi possível detectar altos níveis de TGF- β e baixos de IFN- γ . Quando estas células foram inoculadas nos animais experimentais houve alteração completa da resposta imune celular após desafio, mas neste caso, o parasitismo encontrado foi similar entre os grupos analisados (Passero et al, dados não mostrados). Esta discrepância entre os resultados pode ser o reflexo da diversidade de respostas imunológicas geradas pelas cepas do Novo e Velho Mundos.

Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

A) Padronizar modelo murino de infecção causada por *Leishmania (Viannia) shawi*;

B) Avaliar a proteção induzida por antígenos protéicos de *L. (V.) shawi*.

2.2 – Objetivos específicos

A) Avaliar o grau de proteção induzido por antígenos secretados/excretados por formas promastigotas de *L. (V.) shawi* associando seu efeito com a resposta imune celular;

B) Comparar o grau de proteção e perfil da resposta imune celular e humoral induzidas por antígenos solúveis de formas amastigotas e promastigotas de *L. (V.) shawi*;

C) Purificar antígenos a partir do extrato solúvel das formas promastigotas de *L. (V.) shawi* e avaliar o grau de proteção conferido por estes antígenos;

D) Identificar os componentes presentes no antígeno F1 (fração purificada a partir do extrato solúvel de promastigotas de *L. (V.) shawi*) por espectrometria de massas; e avaliar a proteção duradoura bem como os

principais aspectos da resposta imune celular e humoral induzida por estes componentes.

Materiais e Métodos

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Parasitos

Para os estudos *in vitro* sobre o comportamento biológico de *L. (V.) shawi*, foram utilizadas duas cepas, a MHOM/BR/1989/M8408 (cepa tipo) e MHOM/BR/1996/M15789, cedidas gentilmente respectivamente pela Dra. Elisa Cupolillo do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, e pelo Prof. Dr. Fernando Tobias da Silveira do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará, Brasil, respectivamente. Tais cepas foram classificadas por anticorpos monoclonais e isoenzimas ou na FIOCRUZ ou IEC. As formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, de ambas as cepas, foram obtidas a partir do isolamento de formas amastigotas presente em pata traseira de camundongos BALB/c. Tais formas foram isoladas e expandidas 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 (R10). Todos os experimentos foram realizados com parasitos com no máximo quatro passagens a partir do isolamento e em fase estacionária de crescimento. Todos os experimentos de imunizações experimentais constantes na presente tese foram realizados com a cepa MHOM/BR/1996/M15789.

3.2 - Animais experimentais

Camundongos das linhagens BALB/c ou C57BL/6, isogênicos, com seis semanas de idade foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 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 0280/07. Os animais utilizados nos experimentos realizados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa foram adquiridos do Instituto Gulbenkian de Ciência e mantidos no Biotério do IHMT sob condições similares aos que foram mantidos na FMUSP. O tratamento dos animais esteve de acordo com os requerimentos da União Europeia relativos ao bem-estar dos animais de experiência (86/609/CEE) e reconhecidos pela lei nacional (DR DL129/92 e Portaria 1005/92).

3.3 – Estudos *in vitro*

3.3.1 - Crescimento de formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, de ambas as cepas, foram plaqueadas a uma concentração de 10^6 promastigota/mL em um volume de 10mL, em garrafas de cultura de 45cm² estéreis (TPP). Foram realizadas contagens diárias por 15 dias para se analisar a curva de crescimento das

cepas objetivando encontrar o período que tais parasitos estivessem em fase estacionária de crescimento.

3.3.2 - Isolamento de macrófagos peritoneais e infecção *in vitro* com *L. (V.) shawi*

Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 isogênicos foram sacrificados por deslocamento cervical e em cabine de segurança biológica nível dois, foi inoculado cerca de 5mL de solução fisiológica nos seus peritônios. Com o auxílio de material cirúrgico estéril os peritôneos foram abertos, e os lavados peritoneais aspirados com pipeta Pasteur, e acondicionados em tubos de 15 mL no gelo. As células foram centrifugadas três vezes com PBS estéril, a 1000rpm, 10 minutos, 4°C. As células, de ambas as linhagens de animais, foram contadas em câmara de Neubauer com azul de trypan (na diluição de 1:10 – 20µL de lavado peritoneal e 180µL de *Trypan blue*). Após contagem, 50% das células foram consideradas como sendo macrófagos. As células foram ajustadas a uma concentração de 10^6 macrófagos/mL em meio RPMI 1640 completo e alíquotas de 100µL foram adicionadas em lamínulas redondas que estavam no interior de placas de Petri estéreis. Estas células foram acondicionadas em estufa a 35°C, 5% de CO₂ por aproximadamente 120 minutos para adesão de macrófagos. Em seguida, cada lamínula foi lavada três vezes com PBS a temperatura ambiente para retirar células não aderidas. Tais lamínulas foram adicionadas em placas de 24 poços.

Para a infecção experimental *in vitro*, formas promastigotas de ambas as cepas (item 4.1) em fase estacionária de crescimento foram lavadas em RPMI 1640 (Sigma, USA) completo por 3 vezes, e ajustadas a uma razão de 5 promastigota/macrófago (aproximadamente 5×10^5 promastigota/mL) e 1mL da solução de parasitos foi adicionada a cada poço. Nos poços controles foram adicionados apenas 1mL de RPMI 1640 completo. Após 24h de infecção, os sobrenadantes dos macrófagos infectados e controles foram coletados e congelados imediatamente a -80°C . As lamínulas foram então lavadas três vezes com PBS, secas à temperatura ambiente, fixadas com metanol e coradas com Giemsa, sendo então montadas sob lâminas. As células foram observadas a um aumento de 1000x sendo então contados cerca de 100 macrófagos/lamínula e o índice de infecção foi calculado de acordo com a fórmula:

$\text{Índice de Infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{número de parasitos/macrófago}$

3.3.3 - Quantificação dos níveis de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante dos macrófagos peritoneais infectados e controles de ambas as cepas de camundongos. Esta determinação foi realizada com kit comercial (Dinâmica, Brasil) de acordo com o método descrito por Green et al (1990). Para esta análise, cerca de 100µL dos sobrenadantes das culturas foram incubados com igual volume do reagente de Griess, composto por 1% de sulfonilamida,

0,1% de dihidroclorato de naftilenodiamina e 2,5% de ácido orto-fosfórico, durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após esta etapa de incubação, a placa foi lida em leitor de ELISA utilizando um comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em concentração de nitratos em cultura, com base em uma curva padrão produzida com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (Sigma, EUA) dissolvido em meio de cultura, variando de 3 a 100 μ M de NaNO₃.

3.4 - Evolução da infecção de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 causada por *L. (V.) shawi*

3.4.1 - Infecção *in vivo*

Para a infecção *in vivo* formas promastigotas (de ambas as cepas de *L. (V.) shawi*), em fase estacionária de crescimento, foram coletadas por centrifugação e então lavadas três vezes com PBS a 3000 rpm, 10 min, 4°C, e sua concentração ajustada para 2x10⁷ promastigota/mL.

Foram montados dois grupos experimentais, contendo cada 24 camundongos BALB/c e 24 C57BL/6. Estes animais foram anestesiados com uma solução de tiopental contendo 1mg/200 μ L intraperitonealmente, em seguida, os animais foram infectados com 50 μ L da solução de parasitos, (10⁶ promastigota/pata), na pata traseira direita, a pata traseira esquerda (não infectada) foi utilizada como pata controle para avaliar o tamanho da

lesão, cujas medidas foram efetuadas semanalmente. O tamanho da lesão foi obtido subtraindo-se o tamanho da pata infectada pelo valor da pata não infectada. Camundongos saudáveis (controles) foram inoculados apenas com PBS.

A cada 2 semanas, por um período experimental total de oito semanas, 6 camundongos de ambas as linhagens foram anestesiados com tiopental e então foram sacrificados por sangria total, através de punção cardíaca. Em seguida biópsias das peles do ponto de inoculação, e os linfonodos poplíteais foram coletados para avaliação histopatológica das lesões apenas da cepa M15789. Estes materiais foram acondicionados em formol tamponado 10% para realização de cortes histológicos e coloração com hematoxilina e eosina. Além disso, decalques de baço e fígado de ambas as linhagens de camundongos foram feitos, fixados com metanol e corados com Giemsa, sendo então observados em imersão (aumento de 1000x) para busca de formas amastigotas. O sangue dos animais foi centrifugado a 3000rpm, 4°C, 10min e o soro coletado e estocado a -80°C até seu processamento.

3.4.2 - Imunomarcagem de formas amastigotas

Para evidenciar as formas amastigotas, cortes de pele e linfonodo foram submetidos à reação de imunoistoquímica. Para isso, as lâminas com os respectivos cortes histológicos foram desparafinizados em xilol por 15 minutos à temperatura ambiente, logo após foram hidratados passando por

cubas de álcool absoluto, 70%, 50%, 30% e água, seguido por recuperação antigênica com tampão citrato 10mM, pH 6,0 a 95°C por 30 minutos em banho Maria, seguido de 20 minutos para resfriamento, cerca de 50°C. As lâminas foram retiradas do tampão citrato e foram feitas seis incubações de cinco minutos com peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi realizada uma incubação com leite desnatado (Molico-Nestlé) por uma hora a 37°C. Posteriormente, adicionou-se aos tecidos anticorpo policlonal anti-leishmania produzido em coelho a uma diluição de 1:1600 em PBS com 1% de BSA, 1h, 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos cada com PBS e 0,05% de Tween 20 (PBST), seguido pela adição do anticorpo secundário monoclonal biotinilado anti-IgG de coelho produzido em cabra (Dako) e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após este período, foram feitas três lavagens de cinco minutos com PBST, seguido pela adição de estreptoavidina conjugada a peroxidase (Dako) e incubou-se por 45 minutos a 37°C. Após esse período foram feitas mais três lavagens com PBST por cinco minutos, seguido por incubação de 5 – 10 minutos a temperatura ambiente com uma solução de diaminobenzidina 0,6mg/mL (Sigma, EUA) com 0,03% de peróxido de hidrogênio em PBS. A reação foi interrompida pela adição de água destilada, sendo em seguida as lâminas lavadas com mais água destilada para retirar o excesso da solução de DAB. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por três minutos a temperatura ambiente, desidratadas e em seguida montadas com lamínulas utilizando-se Permount (Sigma).

Para análise da densidade de formas amastigotas, foi utilizado um fotomicroscópio (Zeiss Axioskop 2 plus) acoplado a um microcomputador empregando-se o programa AxioVision 4.0. Para esta análise, foram fotografados no mínimo 10 campos de cada corte histológico (cada corte histológico representava um animal) em objetiva de 40X, e as células imunomarcadas foram contadas utilizando o programa Axiovision 4. Posteriormente, foi calculada a área de cada imagem ($0,03536412 \text{ mm}^2$) e a média de amastigotas imunomarcadas de cada corte foi dividida pela área para o encontro de suas densidades, de acordo com a fórmula:

$\text{Densidade de amastigotas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ médio de amastigotas}}{\text{área total de cada imagem fotografada}}$
--

3.4.3 - Produção de antígeno solúvel de formas promastigotas de *L. (V.) shawi* para análise da resposta imune humoral

Formas promastigotas, em fase estacionária de crescimento, foram lavadas três vezes em PBS, 3000rpm, 10 minutos, 4°C. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* cerca de 300µL de tampão de lise, constituído por 20mM de Tris-HCl, 40mM de NaCl e 10mM de EDTA (pH 7,3). Em seguida os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a temperatura ambiente. Esta solução foi submetida à centrifugação por 30 minutos, 12000rpm, 4°C. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e a

concentração de proteínas foi estimada de acordo com o método de Bradford usando kit comercial (BioRad, EUA). A concentração de proteínas foi estimada utilizando uma curva padrão constituída por albumina bovina na seguinte faixa de concentração: 50 a 500 µg/mL.

3.4.4 - Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliar a resposta imune humoral dos grupos experimentais infectados por *L. (V.) shawi*, placas de ELISA de 96 poços de alta ligação (Costar, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel das formas promastigotas de *L. (V.) shawi* a uma concentração de proteínas de 1,0µg/poço em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (100mM NaHCO₃; 6mM Na₂CO₃), por 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes em tampão fosfato, pH 7,4 (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1 mM Na₂PO₄; 1,76mM KH₂PO₄) com 0,05% de tween 20 (PBST), e bloqueadas com leite desnatado a 10% diluído em PBS por 120min a 37°C. Seguiu-se novamente lavagem das placas, três vezes com PBST, e em seguida 100µL dos soros dos grupos experimentais (BALB/c e C57BL/6) foram adicionados aos poços (1:50) por 60min a 37°C. Controle positivo da reação foi montado usando seis soros de camundongos BALB/c cronicamente infectados com a *L. (V.) shawi* (cepa M15789) por um período de aproximadamente quatro meses. Os soros dos animais saudáveis foram utilizados como controles negativos das reações. Após este período, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBST seguido pela adição de anticorpo secundário anti-IgG total de camundongo produzido em cabra e conjugado com

fosfatase alcalina (Sigma, EUA) na diluição de 1:1000 por 60 minutos a 37°C. Seguindo outra lavagem das placas com PBST, o substrato para-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Sigma, EUA) diluído em tampão fosfato a uma concentração de 1mg/mL, (pH 9,6) foi adicionado aos poços por 30min. A placa foi então lida em leitor de ELISA a 405nm. Também foram avaliados os isótipos nos soros destes animais. O procedimento empregado foi essencialmente o mesmo, exceto pelo fato de que os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG1 e anti-IgG2a (Invitrogen, EUA) produzidos em cabra e conjugados com peroxidase. Neste conjunto de experimentos, para desenvolvimento da reação, foi usado o substrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina com peróxido de hidrogênio (TMB) (B&D, EUA) e a solução foi parada através da adição de H₂SO₄, 2N.

3.5 - Produção de antígenos de *L. (V.) shawi* para imunizações experimentais

Todos os antígenos obtidos na presente tese e utilizados para imunizar os animais experimentais foram esterilizados através de filtros de malha 0,22µm (Millipore, EUA).

3.5.1 – Antígenos secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi*

Esta parte da presente tese foi desenvolvida em colaboração com a Profa. Dra. Gabriela Santos-Gomes, do Instituto de Higiene e Medicina

Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Portugal. Para estas imunizações houve variações daquelas que foram empregadas para as outras imunizações analisadas na presente tese, sobretudo no que diz respeito a análise da resposta imune celular.

Formas promastigotas no 6º dia de cultura foram concentradas por centrifugação a 3000rpm, 10min, 4°C e lavadas três vezes com PBS a 3000rpm, 10min, 4°C. Após última centrifugação, estes parasitos foram contados e cerca de 5×10^8 a 10^9 promastigotas foram acondicionados em 30mL de meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino ou qualquer outra fonte protéica por cerca de 24h a 25°C. Após este período, a cultura foi novamente contada para verificar taxa de sobrevivência e então centrifugada a 3000rpm, 10min, 4°C. O sobrenadante foi coletado e concentrado imediatamente em centricons (Millipore, Alemanha) 4500rpm, 20min, 4°C. Os centricons possuíam um cut-off de 3kDa. A quantidade de proteínas neste material foi estimada através do método de Bradford.

Este material previamente concentrado foi submetido à eletroforese seguindo os preceitos de Laemmli (1970). Após corrida eletroforética um dos géis foi corado com nitrato de prata, o outro foi submetido à eletroeluição das frações protéicas, de acordo com o trabalho de Rosa, et al (2007), onde as bandas entre 75 a 250 kDa foram consideradas pertencentes ao grupo dos antígenos de alta massa molecular (MM), as proteínas compreendidas abaixo de 75 a 37kDa foram consideradas pertencentes ao grupo dos antígenos de média MM e as proteínas abaixo de 37kDa foram consideradas pertencentes ao grupo de baixa MM.

3.5.2 - Produção dos antígenos solúveis das formas amastigotas (AgAma) e promastigotas (AgPro) de *L. (V.) shawi*

O antígeno solúvel das formas promastigotas (AgPro) de *L. (V.) shawi* seguiu o procedimento descrito no item 3.6.3.

As formas amastigotas teciduais foram isoladas de acordo com o método descrito por Singal et al 2005, com pequenas modificações. As formas amastigotas de *L. (V.) shawi* foram purificadas das patas traseiras de camundongos BALB/c infectados cronicamente, cerca de quatro meses. Após sacrifício dos camundongos, as patas traseiras foram extraídas, acondicionadas em álcool 70% por cerca de cinco min. Em seguida as unhas foram retiradas e o debridamento da pata efetuado. O material biológico restante provindo das patas foi cortado em pequenos pedaços e macerado em peneiras celulares (*Cell strainer*) de 70µm (B&D, EUA). A suspensão obtida foi submetida a repetidas passagens em agulha número 1x30; 0.9x25 e 0.55x20 mm acopladas a seringas de 10mL para liberar as formas amastigotas das células hospedeiras. A purificação das amastigotas foi efetuado através da montagem de um gradiente de Percoll (Sigma, EUA) em PBS contendo 550mM de glicose e 20mM de EDTA. A suspensão contendo as formas amastigotas foi lavada três vezes com PBS a 3000rpm, 10min, 4°C e o pellet resultante foi ressuspendido em 4mL de Percoll 45%. A um tubo de 15mL foi montado o gradiente, constituído na base por 1.5mL de Percoll 70%, seguido por 4mL de Percoll 45% (contendo as formas amastigotas) e pela fase superior contendo 4.5mL de Percoll 70%. Este gradiente foi centrifugado a 4500rpm, 90min, 4°C. Após centrifugação, a

interface entre 45 e 70% (contendo as formas amastigotas purificadas), foi coletada e lavada três vezes com PBS a 3000rpm, 10min, 4°C. Uma parte do pellet obtido foi colocada em cultura e a outra parte foi ressuspensa em tampão de lise, que foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada a temperatura ambiente por três vezes; posteriormente esta suspensão foi centrifugada a 10000xg por 1h, 4°C e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C.

É importante frisar que antes e após a purificação das amastigotas usando gradiente de Percoll, células do hospedeiro e formas amastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer com o objetivo de se analisar o grau de pureza e a porcentagem de rendimento das amastigotas. A pureza variou entre 93 a 96% e o rendimento esteve na ordem de 90 a 95%. Além disto, alíquotas das amastigotas purificadas que foram adicionadas ao meio R10 mostraram-se capazes de se diferenciar em formas promastigotas, indicando que o processamento para purificação de tais formas não alterou a viabilidade dos parasitos.

3.5.3 - Purificação de antígenos das formas promastigotas de *L. (V.) shawi* através de HPLC de fase reversa

O antígeno solúvel das formas promastigotas (item 4.6.3) foi liofilizado e então o material obtido foi alíquotado em eppendorffs, que continham cerca de 10 a 15mg de antígeno liofilizado. Esta massa foi utilizada com base no máximo limite de material seco em que é permitido injetar na coluna

cromatográfica.

O sistema cromatográfico utilizado para a purificação foi o HPLC PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 1ml e uma coluna microbodapack C5 0,78 X 30 cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA), pH 3,5 (tampão A) por 15 minutos. Paralelamente, a amostra foi solubilizada em 200µL de tampão A e então centrifugada para *pelletar* qualquer material insolúvel. Em seguida, o sobrenadante da amostra foi aplicado na coluna cromatográfica e a corrida foi monitorada a 280nm. A eluição das amostras foi realizada usando um gradiente linear com Acetonitrila 66% em 0.1% de TFA (tampão B) a um fluxo constante de 1mL/minuto, sendo o tempo total de corrida fixado a 55 minutos. Os principais picos protéicos foram coletados, liofilizados e estocados a -80°C para posterior quantificação protéica. Através desta metodologia foram obtidos cinco diferentes antígenos, sendo nomeados F1, F2, F3, F4 e F5.

3.6 - Análises bioquímicas e bioinformáticas dos antígenos

3.6.1 – Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli 1970. As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de empacotamento na

concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%. O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando o tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito utilizando o tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,8. Em ambos os géis foram acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de peso molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromo fenol) e em seguida desnaturados a 100°C, 3 minutos e logo aplicados no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA, por cerca de 30 minutos. Os géis foram então corados com nitrato de prata, utilizando kit comercial (Sigma, EUA).

3.6.2 - Identificação do antígeno F1 através de espectrometria de massas

F1 adquirido através de HPLC de fase reversa foi solubilizado em ácido fórmico 0,1% e injetado em uma coluna C18 (75 µm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplado a um espectrometro de massas (Waters) com uma fonte de nano-eletrospray a um fluxo de 0,6 µL/min. O gradiente utilizado foi composto de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico por um período total de 45 minutos. O instrumento foi operado em um modo “top three”, onde um espectro adquirido seguido pelo MS/MS dos picos mais intensos detectados. Os espectros foram adquiridos usando o programa MassLynx 4.1 e os dados foram convertidos ao formato mgf pelo programa Mascot Distiller 2.3.2.0 (Matrix Science) em seguida foi realizada a

busca na base de dados NCBI usando busca MASCOT com carbamidometilação com modificação fixada, oxidação da metionina como modificação variável e a tolerância de 0,1Da para ambos precursores e fragmentos de íons. Fragmentos que não foram identificados através da busca MASCOT foram submetidos à busca no banco de dados BLAST do NCBI.

3.6.3 Análise de predição de ligação dos antígenos a MHC-I e MHC-II

A base de dados PredBALB (<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>) se constitui em uma das únicas bases disponíveis capazes de prever quais peptídeos são ligantes ao complexo principal de histocompatibilidade I e II (Zhang et al., 2005). Para tal análise, cada um dos peptídeos obtidos na espectrometria de massas foi adicionado à base de dados do PredBALB, sendo utilizado um *cut-off* de 8, ou seja, todos os fragmentos que obtiveram uma pontuação de ligação igual ou maior que 8 foi considerado como ligadores a um dos haplótipos de MHC-I ou MHC-II.

3.7 – Imunizações experimentais e desafio

Os antígenos obtidos foram utilizados para imunizar camundongos BALB/c. Para isto, foram montados grupos contendo oito camundongos por grupo. Estes animais foram imunizados duas vezes, semanalmente, através da rota subcutânea no dorso com 25µg/100µL. Animais controle (16 no total)

foram injetados apenas com 100µL de PBS. Após 1 semana da última imunização, os camundongos imunizados foram desafiados intradermicamente na pata traseira direita com 10^6 promastigotas/50µL em fase estacionária (grupos desafiados). Oito dos animais que foram injetados apenas com PBS foram infectados com as formas promastigotas (grupo infectado) e outros oito foram injetados apenas com PBS (50µL) intradermicamente na pata (grupo saudável). A evolução da lesão nos grupos imunizados com os antígenos secretados/excretados, AgAma e AgPro foi monitorada por seis semanas e nos grupos imunizados com as frações protéicas purificadas a evolução da lesão foi acompanhada por oito semanas pós desafio.

3.8 - Análise de imunidade duradoura induzida pelo antígeno F1

Grupos de seis camundongos BALB/c foram imunizados como descrito no item 3.7. Após 16 semanas da última imunização, estes animais foram desafiados intradermicamente (item 3.7). A evolução da lesão foi acompanhada por oito semanas com medidas semanais do tamanho da lesão. Este grupo foi nomeado como F1 – 4 meses.

3.9 - Análise da carga parasitária

A carga parasitária dos animais imunizados com cada um dos

antígenos citados foi analisada através de diluição limitante. Animais pertencentes aos grupos experimentais foram anestesiados com solução de tiopental (1mg/100µL) e foram sangrados através de punção cardíaca. Em seguida, fragmentos de pele e linfonodos foram coletados e pesados. Estes materiais foram macerados, diluídos a 1:1000 em meio Schneider (Sigma, EUA), suplementado com 10% SFB, 10µg/mL de gentamicina e 1000UI de ampicilina, e então 200µL desta solução foi adicionada em poços de placa de 96 poços estéreis em quadruplicata. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (1:4) deste material em dodeplicata, nas próprias placas. Estas placas foram vedadas para evitar evaporação e incubadas a 25°C, por 15 dias, para que as amastigotas viáveis se diferenciarem em promastigotas. Após o período citado, cada placa foi observada e a maior titulação em que foi possível observar formas promastigotas foi anotada e a concentração de formas promastigotas/massa de cada órgão foi estimada seguindo a expressão matemática:

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

3.10 - Análise da resposta imune celular

Os linfonodos dos grupos experimentais foram masserados e lavados em meio RPMI. Em seguida as células foram contadas com auxílio de azul de trypan e as suas concentrações ajustadas a 5×10^5 célula/poço e cultivadas em placas de 96 poços. Estas células foram então estimuladas com antígeno total de formas promastigotas (10µg/poço). No caso dos

animais que foram imunizados com as frações protéicas, as células providas de cada grupo também foram estimuladas com sua respectiva fração (1,0 µg/poço). Células sem estímulo também foram avaliadas. As placas contendo as células com ou sem estímulos foram acondicionadas em estufa umidificada a 37°C, 5% CO₂, por 72h, quando tais placas foram centrifugadas a 1000rpm, 10min, 4°C para coleta de sobrenadante e dosagem de citocinas.

As citocinas foram dosadas de acordo com o método descrito pelo fabricante (B&D, USA). São elas: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN-γ, TNF-α e TGF-β. Anticorpos monoclonais de captura anti-IL-2 (1:250), anti-IL-4 (1:250), anti-IL-10 (1:250), anti-IL-12 (1:250), anti-IFN-γ (1:250), anti-TNF-α (1:1000) e anti-TGF-β (1:250) foram adsorvidos em placas de ELISA por 18h a 4°C. Em seguida tais placas foram lavadas três vezes com solução de PBST e após este passo foi adicionada uma solução de bloqueio das ligações inespecíficas, constituído por PBS contendo 10% soro fetal bovino por 1h a temperatura ambiente (TA). Após este período, mais três lavagens com PBST foram realizadas, seguido pela adição dos sobrenadantes de células estimuladas ou não, este material foi incubado a temperatura ambiente por 2h, a TA. Em seguida, foram realizadas mais três lavagens com PBST e então foram adicionados os anticorpos de detecção biotinilados e conjugados com streptoavidina anti-IL-2 (1:250), anti-IL-4 (1:250), anti-IL-10 (1:250), anti-IL-12 (1:250), anti-IFN-γ (1:250), anti-TNF-α (1:1000) e anti-TGF-β (1:250) por 1h, TA. Mais seis lavagens foram efetuadas após este passo, e seguiu-se pela adição do substrato TMB. A reação foi desenvolvida

por aproximadamente 15 minutos, quando então foi adicionado 50µL de H₂SO₄, 2N para finalização da reação. As placas foram lidas a 450nm em leitor de ELISA (Costar, EUA). A concentração de cada citocina foi estimada com base em uma curva padrão construída com as citocinas.

A análise da proliferação celular foi efetuada apenas nos grupos F1 – 4 meses, infectado e saudável. As células cultivadas por 72h estimuladas ou não foram lavadas três vezes em PBS e então foi adicionada 50µL de PBS contendo 5,0mg/mL de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por 4h, em estufa umidificada, 37°C, 5% CO₂. Após este período, foi adicionado 50µL de solução de PBS contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para solubilizar membranas biológicas e liberar do meio intracelular o formazan convertido pelas células. Após 18h, as placas foram lidas a 595nm e a taxa de proliferação celular foi estimada a partir da média de absorbância de cada grupo experimental.

A análise da resposta imune celular realizada para as imunizações com os antígenos secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi* foi realizada de forma diferencial das outras análises, uma vez que elas foram desenvolvidas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Portugal. A metodologia descrita abaixo é comumente utilizada para análise da resposta imune celular na instituição.

Linfonodos popliteos dos animais imunizados, desafiados, infectados e saudáveis foram masserados e suas células contadas com auxílio de azul de trypan. Em seguida, as células recuperadas dos linfonodos foram lavadas

em tampão de lavagem (2mM EDTA; 0,5% BSA em PBS – *MACS buffer*) e então incubadas com *microbeads* acopladas a anticorpos monoclonais anti-CD4 L3T4 e anti-CD8 α (usando a proporção de 10^7 células para cada 10 μ L de anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 e 90 μ L de tampão de lavagem) de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi biotech, Alemanha). Após 15 minutos de incubação a 4°C, foi adicionado cerca de 3 mL do tampão de lavagem às células, que foram então centrifugadas a 1000 rpm, 10min, 4°C. Em seguida, estas células foram ressuspensas em 500 μ L de tampão de lavagem (2mM EDTA e 10% de albumina bovina em PBS). Paralelamente, foi acoplada uma coluna de separação (MS, Miltenyi Biotec) ao magneto, que foi equilibrada anteriormente a aplicação da amostra com 1mL de tampão de lavagem. Após eluição deste tampão, a amostra foi aplicada à coluna e 3 lavagens (500 μ L) com o tampão foram realizadas. Após estas lavagens, a coluna de separação foi removida do magneto e 1 mL do tampão de lavagem foi adicionado no interior da coluna, sendo então os linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ eluídos pela aplicação de pressão com o êmbolo da coluna. Células negativas para os marcadores CD4 e CD8 (duplo negativas CD4⁻ CD8⁻ – dnCD4CD8) também foram analisadas. Estas 3 subpopulações celulares (CD4⁺, CD8⁺ e dnCD4CD8) foram lavadas com tampão de lavagem e o número de células foi ajustado para 5×10^5 . Em seguida, procedeu-se a extração de DNA para quantificação da expressão de IFN- γ e IL-4 através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Além disso, as células previamente separadas através de *microbeads* foram imunofenotipadas através de citometria de fluxo utilizando

os seguintes marcadores: anti-CD3 ϵ (FITC), anti-CD4 L3T4 (Percp) e anti-CD8 α (APC). Tais análises demonstraram que 96% da população de células CD4 $^{+}$ purificadas através das *microbeads* eram linfócitos TCD4 $^{+}$ e 93% da população de células CD8 $^{+}$ purificadas eram linfócitos TCD8 $^{+}$.

3.10.1 Quantificação da expressão de IFN- γ e IL-4

Anteriormente à quantificação, foi necessário produzir padrões de HPRT, IFN- γ e IL-4. Para isto, baços de animais saudáveis foram extraídos, masserados e cultivados sob estimulação com 1 μ g/ml de Concanavalina A (Sigma, EUA).

Após 72h de cultivo, o RNA total foi extraído de culturas de aproximadamente 5×10^5 células, utilizando um kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), sendo o protocolo efetuado de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram desnaturadas durante 5 min a 65 °C e posteriormente sintetizadas em cDNA através de uma reação de transcrição reversa a 37 °C, durante 60 min, na presença de 200U da enzima transcriptase reversa (*Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase* - MMLV-RT; Promega, USA), 3 mM do tampão MMLV-RT (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT) (Promega), 10 mM de BSA (Roche), 0.5 mM desoxirribonucleotídeos (dNTPs) (Bioline, UK), 0.1 μ g Oligo (dT)15 (Promega) e 40 U da enzima inibitória da ribonuclease (RNAsin) (Promega) e 1 μ g de RNA de cada amostra. Por último, as amostras foram aquecidas a 95 °C, durante 5 min, para inativação

da enzima RT, e acondicionadas a -20 °C. Em cada reação foi incluído um controle negativo (amostra sem RNA).

A escolha das seqüências de primers sense e anti-sense de cada gene, descritos na Tabela I, foram desenhadas usando o software bioedit.

Tabela I - Genes-alvo, seqüências dos primers sense e anti-sense e referência bibliográfica das citocinas IFN- γ e IL-4 e do gene de controle interno HPRT.

Genes	Primers sense (SE) e reverse (RE)	Referências
HPRT	SE – 5' GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT 3' RE – 5' CCAGCAGGTCAGCAAAGAACT 3'	Rodrigues et al., 2006
IFN- γ	SE – 5' ATGATCCGCGACGTGGAA 3' RE – 5' ACCGCCTGGAGTTCTGGAA 3'	Rodrigues et al., 2006
IL-4	SE – 5' CTGCTCTCCTTTCTCAGGGGT 3' RE – 5' GTGTGCAGTGCTATCATCCAA 3'	Rosa et al., 2006

3.10.2 – PCR, purificação e clonagem do produto amplificado em vetores plasmídeos

O cDNA (2 μ L) de cada gene foi amplificado por PCR convencional usando uma concentração final de 0.5 μ M de cada primer (sense e antisense), 1X tampão de reação (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % Tween 20) (Bioline), 2.5 μ M MgCl₂ (Bioline), 0.2 mM dNTPs e 0.04 U/ μ L da enzima *Taq* polimerase (Bioline) em um volume final de 18 μ L.

O termociclo utilizado foi o seguinte:

94°C	5 min		
94°C	20 seg	}	30 ciclos
Ta= 59°C	30 seg		
72°C	30 seg		
72°C	3 min		

Os fragmentos amplificados a partir do cDNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (Sigma, EUA) ao qual se adicionou brometo de etídio (concentração final 0.5µg/mL) em tampão TAE 1X (0.04 M Tris-HCl pH 8.0, 0.02 M acetato de sódio, 0.002 M EDTA) durante cerca de 80 min a 100 V. Confirmou-se a presença dos genes através da sua visualização no sistema UVIDOC (Alfagene, EUA) sob luz ultravioleta, por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado com o DNA.

Os produtos obtidos foram purificados usando o kit comercial *High Pure PCR Product Purification* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo é realizado para remover sais, restos de primers e nucleotídeos não incorporados que podem interferir com a inserção do gene no vetor plasmideal. O produto de PCR purificado foi quantificado usando o espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, o produto purificado de cada gene foi inserido no vetor pGEMT (Promega,

Alemanha) uma vez que durante a amplificação por PCR dos genes em estudo a enzima utilizada (*Taq* polimerase) apresenta atividade *proofreading*, ou seja, adiciona ao gene uma cauda 3'-A que assim se ligará aos terminais T no vetor pGEMT Easy linearizado. Para cada reação, usou-se 5 µL tampão de ligação, 1 µL da enzima T4 DNA ligase, 1 µL do vetor pGEM-T Easy Vector e a quantidade apropriada do gene purificado, em um volume final de 10 µL, incubando-se em seguida a 4 °C, 18h. A quantidade necessária de gene para a reação de ligação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng gene}}{\text{tamanho de vetor (kb)}} = \frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do gene (kb)} \times \text{razão gene:vetor}}{\text{tamanho de vetor (kb)}}$$

A proporção gene:vetor foi otimizada para 9:1, a quantidade de vetor utilizada foi 50 ng e o tamanho do vector em kb é de 3.015.

A transformação dos fragmentos ligados ocorreu em *Escherichia coli* competentes (*JM 109 High Efficiency Competent Cells*; Promega) após adicionar 50 µL das bactérias e 2 µL da reação de ligação, as células foram incubadas por 20 min no gelo. As células foram posteriormente submetidas a um choque térmico a 42 °C durante 60 segundos e imediatamente colocadas no gelo durante 2 min. Juntou-se 950 µL de meio SOC (Promega) e as bactérias transformadas foram incubadas a 37 °C sob agitação (150 rpm) durante 1h. 100 µL de cada cultura transformada foi plaqueada em placas de Luria broth – LB - (Lennox, Scharlau Microbiology), contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma), 0.5 mM de *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) (Sigma) e 80 µg/mL de *5-bromo-4-chloro-3-*

indolyl-galactopyranoside (X-Gal) (Sigma) permitindo a identificação dos recombinantes através da diferenciação de colônias brancas e azuis. As placas foram incubadas a 37°C entre 16-18 h e as colônias de cor branca resultantes da interrupção da funcionalidade da sequência do gene que codifica a β -galactosidase (lacZ) e que por isso não possuem os plasmídeos recombinantes com o gene corretamente clonado, foram crescidas em 10 mL de meio LB com ampicilina, sob agitação (250 rpm), durante 12-16 h. O DNA plasmideal foi extraído usando o kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Após purificação, foi confirmada a presença dos genes através de PCR convencional e eletroforese em gel de 3 % de agarose. Além disso, foi feita uma análise de restrição com a enzima Bcn I que corta regiões específicas do vetor pGEMT, gerando quatro fragmentos ou bandas de diferentes tamanhos esperados e dependendo da presença ou não do gene de interesse. Assim, 4 μ L do plasmídeo recombinante foram incubados durante 2 h a 37°C, juntamente com 1 μ L da enzima de restrição Bcn I, 10 μ L de 1x tampão Tango (33 mM de Tris-acetato, pH 7.9, 10 mM de acetato de magnésio, 66 mM de acetato de potássio e 0.1 mg/mL de BSA) e 4 μ L de água Mili Q. Os fragmentos obtidos foram visualizados após eletroforese (1 h a 110 V) em gel de agarose (1 %).

3.10.3 - Construção de curvas padrão e PCR em tempo real para a quantificação absoluta da expressão gênica

As curvas-padrão para cada gene foram construídas após a

quantificação do DNA plasmideal recombinante de cada gene pretendido e obtido por clonagem (*NanoDrop 1000*, Thermo Fisher Scientific). Fizeram-se diluições em série de 0.016 a 250 pg/μL e reações independentes de PCR em tempo real, nas quais as amostras dos padrões foram utilizadas em duplicata. A partir das curvas-padrão obtidas calculou-se a eficiência de amplificação ($E=10^{1/-\text{DECLIVE}} - 1$) para cada gene. Consideraram-se aceitáveis os ensaios com eficiência superiores a 90 %.

A quantificação absoluta da expressão de mRNA dos genes codificadores de IFN-γ e IL-4 foi analisada em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como células dnCD4CD8, após extração de RNA e síntese de cDNA das células dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. O PCR em tempo real foi realizado no equipamento ABI GeneAmp 5700-sequence detection system (Applied Biosystems, USA) em um volume total de 20 μL contendo 2 μL de cDNA de cada amostra ou de cada diluição do DNA plasmideal (padrão), 300 nM dos primers sense e anti-sense específicos de cada gene e 10μL de SYBR Green I dye PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: 10 minutos a 95 °C para a ativação da AmpliTaq Gold, seguidos de um total de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Número de cópia de cada gene foi normalizado pelo HPRT e os resultados foram expressos como número de cópias de cada gene por 1000 cópias de HPRT.

3.11 - Análise da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada no soro dos diferentes grupos de camundongos imunizados, desafiados, infectados e saudáveis, de acordo com o item 3.4.3

3.12 - Análise das populações de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD45RB⁺ e CD62L⁺ nos grupos imunizados com o antígeno F1

As análises dos linfócitos foram realizadas através de citometria de fluxo. Camundongos BALB/c pertencentes aos grupos submetidos à imunização com F1 e posteriormente desafiados, infectados e saudáveis foram sacrificados, seus linfonodos popliteos foram masserados e as células foram contadas com azul de trypan. As células dos grupos foram ajustadas para a concentração de 8×10^6 células/mL e então foram adicionadas em placas de 96 poços, fundo em formato V para marcação com cada um dos anticorpos (B&D, EUA). Inicialmente, as células foram lavadas 2 vezes com *MACS buffer* a 1000 rpm, 10min, 4°C. Em seguida, estas células foram ressuspensas em um volume final de 50µL de *MACS buffer* conjuntamente com os anticorpos monoclonais anti-CD3ε (FITC), anti-CD4 L3T4 (PerCP), anti-CD8α (Alexa Fluor 700), anti-CD45RB (PE) e anti-CD62L (APC) previamente diluídos a 1:100 por 30 minutos a 4°C, no escuro. Após este período, as células foram submetidas a duas lavagens com 170 µL de *MACS buffer* e fixadas com 100µL de paraformaldeído 1%. A aquisição das amostras foi feita em um citômetro FACSCanto (B&D). Para compensação,

foram utilizado *beads* (B&D) monomarcadas com cada um dos anticorpos utilizados. Foram adquiridos cerca de 8×10^5 eventos para cada grupo experimental e os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo (TreeStar, EUA). A estratégia de análise se baseou na identificação inicial das células $CD3^+$, seguido pelos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, tais populações linfocitárias foram em seguida caracterizadas pelo marcador $CD62L$ de acordo com sua baixa (low) e alta (high) expressão de tal marcador.

Após aquisição de dados no programa computacional, foi calculada a frequência média de cada uma das populações linfocitárias bem como as populações $CD3^+CD4^+CD62L$ e $CD3^+CD8^+CD62L$. A estratégia para aquisição de dados é simplificada na figura 5.

Figura 5 – Estratégia de gate utilizada para analisar a frequência de linfócitos T. A imagem exemplifica a imunofenotipagem dos linfócitos T $CD8^+$ dos grupos saudáveis.

3.13 - Análise estatística

Os experimentos foram repetidos três vezes. Cada grupo experimental foi constituído por seis a oito camundongos da linhagem BALB/c e/ou C57BL/6. Os dados estão apresentados como a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística empregada foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de grupos múltiplos. Posteriormente, foi feito o teste de Mann-Whitney para análises pareadas. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$

Resultados

4 - RESULTADOS

4.1 – Estudos *in vitro*

4.1.1 - Crescimento das formas promastigotas

O crescimento das formas promastigotas de ambas as cepas em cultura foi investigado por um período de 15 dias. Os dados obtidos mostraram que as cepas apresentaram um perfil diferenciado de crescimento, com uma fase lag de aproximadamente três dias, uma fase logarítmica de dois dias para a cepa M15789 e de três para a M8408, seguido por uma fase estacionária de três dias para a cepa M15789 e de 2 dias para a M8408. Em seguida ocorre um declínio em ambas as culturas. Comparativamente, a cepa M15789 proliferou significativamente mais em comparação a M8408 ($p < 0.05$) a partir do 2º dia de cultura (figura 6).

Figura 6 – O crescimento das formas promastigotas das cepas M15789 e M8408 foi acompanhado por 15 dias, com contagens diárias. † $p < 0.05$ indica que o crescimento da cepa M15789 diferiu significativamente da M8408.

4.1.2 – Infecção *in vitro* de macrófagos e produção de nitratos

Foram realizadas infecções *in vitro* em macrófagos peritoneais com o objetivo de comparar a infectividade das cepas M15789 e M8408 através do índice de infecção. Neste caso, a cepa M15789 apresentou um índice de infecção significativamente maior que o da cepa M8408 ($p < 0.05$) em ambos os macrófagos peritoneais isolados dos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, na ordem de 3,5 e 5,2 vezes, respectivamente (figura 7A).

Por outro lado, os macrófagos peritoneais de ambas as linhagens de camundongos produziram níveis similares de nitratos, independentemente da cepa usada na infecção *in vitro* (figura 7B).

Figura 7 – Índice de infecção (A) e níveis de nitratos (B) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com formas promastigotas de *L. (V.) shawi*. * $p < 0,05$ indica que o índice de infecção da cepa M15789 diferiu significativamente da M8408 em ambos os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6.

4.2 – Estudos *in vivo*

4.2.1 – Comparação da infectividade das cepas M15789 e M8408 de *L. (V.) shawi*

Foi realizada uma infecção comparativa entre as duas cepas de *L. (V.) shawi* nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6.

Tanto em camundongos BALB/c (figura 8A) quanto em C57BL/6 (figura 8B) a cepa M15789 foi mais infectiva em comparação a M8408 a partir da 2ª e 3ª semanas pós-infecção (PI), respectivamente. Como a cepa M15789 foi mais infectiva, os estudos subseqüentes foram desenvolvidos empregando-se tal cepa.

Figura 8 – Comparação entre as infectividades das cepas M15789 e M8408 foi medida através do tamanho da lesão no sítio da inoculação subcutânea nas patas traseiras de camundongos das linhagens BALB/c (A) e C57BL/6 (B). † $p < 0.05$ indica que o crescimento da lesão de camundongos infectados com a cepa M15789 diferiu significativamente da M8408.

4.2.2 – Comparação da infectividade e patogenicidade da cepa M15789 em camundongos BALB/c e C57BL/6

4.2.2.1 – Tamanho de lesão e densidade parasitária na pele e em linfonodos popliteais

O curso da lesão nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foi similar até a 3ª semana PI (figura 9). A partir deste período experimental, houve crescimento significativo do tamanho de lesão em ambas as linhagens de camundongos até a 8ª semana PI ($p < 0,05$). Após a 3ª semana PI os camundongos BALB/c apresentaram tamanho de lesão superior aos C57BL/6 ($p < 0,05$), sendo que na 8ª semana PI este aumento foi de 1,7 vezes.

Figura 9 – A evolução da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. (V.) shawi* foi analisada durante oito semanas. * e ** $p < 0.05$ indicam que o tamanho da lesão diferiu significativamente do início da infecção nos camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente; † $p < 0.05$ indica que o crescimento da lesão de camundongos BALB/c diferiu significativamente do que em C57BL/6.

A densidade de formas amastigotas na pele de ambas as linhagens de camundongos aumentou significativamente com a evolução da lesão, e em comparação à 2ª semana PI todos os períodos experimentais apresentaram aumento da carga parasitária na pele ($p < 0,05$). Comparativamente, os camundongos da linhagem BALB/c apresentaram as maiores densidades parasitárias (Figura 10) em relação aos camundongos C57BL/6 a partir da segunda semana PI ($p < 0,05$), na ordem de 2,2; 2,3 e 1,5 vezes, respectivamente.

Figura 10 – Densidade das formas amastigotas na pele de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. (V.) shawi*. * e ** $p < 0.05$ indicam que a densidade de amastigotas na pele diferiu significativamente da 2ª semana PI nos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, respectivamente; † $p < 0.05$ indica que a densidade de amastigotas na pele dos camundongos BALB/c foi significativamente maior que em C57BL/6.

Através da metodologia empregada, foi possível detectar formas amastigotas nos linfonodos popliteais dos camundongos de ambas as linhagens na 6ª e 8ª semana PI, mas sem diferenças significativas na densidade parasitária entre tais períodos experimentais e as linhagens de camundongos (figura 11).

Figura 11 - Densidade das formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. (V.) shawi*.

Nos decalques de baço e fígado de ambas as linhagens de camundongos não foram encontradas formas amastigotas.

4.2.2.2 – Análise histopatológica

Nos camundongos da linhagem BALB/c, foi observado na 2^a semana PI um infiltrado inflamatório discreto na derme constituído por células polimorfonucleares e mononucleares com um parasitismo discreto. Na 4^a semana PI, este infiltrado inflamatório apresentou-se em caráter moderado distribuído mais difusamente pela derme, formado por altas densidades de células mononucleares com um parasitismo moderado. Áreas focais de necrose foram observadas (Figura 12 – de A a C). Na 6^a e 8^a semanas PI foi observado um perfil histopatológico similar, onde um infiltrado inflamatório

intenso estava distribuído difusamente pela derme, formado por muitos macrófagos altamente parasitados, linfócitos, poucos plasmócitos, presença de baixa densidade de leucócitos polimorfonucleares, sendo encontradas áreas de necrose tecidual (Figura 12 – de D a F).

Figura 12 – Aspecto histopatológico da pele de camundongos BALB/c. A - Aos 30 dias PI, o infiltrado inflamatório esteve distribuído difusamente pela derme (coloração em H&E, aumento de 100x); B – infiltrado inflamatório misto com presença de moderadas densidades de células polimorfonucleares aos 30 dias PI (coloração em H&E, aumento de 200x); C - o parasitismo foi moderado aos 30 dias PI (imunomarcação de formas amastigotas, aumento de 400x). D - aos 60 dias PI houve um intenso infiltrado inflamatório difuso pela derme com presença de necrose tecidual (coloração em H&E, aumento de 100x); neste período detectou-se baixas densidades de polimorfonucleares (coloração em H&E, aumento de 400x); F - alto parasitismo tecidual aos 60 dias PI(imunomarcação de formas amastigotas, aumento de 400x). As setas indicam as formas amastigotas e o asterisco os polimorfonucleares.

Através de coloração em H&E também foi possível verificar as modificações ocorridas nos linfonodos popliteos dos grupos dos animais infectados com *L. (V.) shawi*. Na 2ª semana PI não foram encontradas formas amastigotas, porém os folículos linfóides mostravam um leve grau de ativação, constatado pela presença de poucas células com núcleos grandes com cromatina frouxa e nucléolo proeminente. Na 4ª semana PI o quadro histológico do linfonodo era semelhante, o parasito ainda não pôde ser encontrado e a ativação folicular ainda era discreta. Na 6ª semana PI foram encontradas poucas formas amastigotas no interior de macrófagos na região subcapsular. A região medular havia poucos macrófagos discretamente infectados. A região da cápsula apresentava-se espessada por uma infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares. Foi observada também uma ativação mais proeminente dos centros germinativos (Figura 13 A, B e C). Na 8ª semana PI um número maior de parasitos foi observado no interior de macrófagos na região subcapsular e também em macrófagos na região medular do linfonodo. Os centros germinativos se mostravam maiores e com maior grau de ativação (Figura 13 D, E e F). Os linfonodos dos animais controles, em todos os períodos experimentais, não apresentaram alterações histológicas.

Figura 13 - Aspecto histopatológico de linfonodos dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) shawi*. A - aos 45 dias PI, foi observado uma maior ativação dos folículos linfóides (seta, aumento de 200x, coloração H&E); B - espessamento da cápsula com a presença de polimorfonucleares aos 45 dias PI (asteriscos, aumento de 400x, coloração em H&E); C – presença de formas amastigotas intracelulares na região medular aos 45 dias PI (seta, aumento de 400x, imunomarcação). D - aos 60 dias PI, foi observado uma maior ativação dos folículos linfóides (seta, aumento de 200x, coloração H&E); E – presença de infiltrado misto, evidenciado polimorfonucleares e parasitos aos 60 dias PI (seta e asterisco, aumento de 400x, coloração em H&E); F – aumento de parasitismo na região medular maior parasitismo foi verificado aos 60 dias PI (aumento de 400x, imunomarcação de formas amastigotas).

Na 2ª semana PI foi observado um discreto e focal infiltrado inflamatório na derme, formado por células polimorfonucleares e mononucleares. O parasitismo foi considerado discreto. Na 4ª semana PI, o infiltrado inflamatório ainda era discreto, porém com distribuição difusa pela derme, sendo caracterizado pela presença de células polimorfonucleares, linfócitos e mononucleares ainda com baixo parasitismo (Figura 14 – de A a C). À 6ª semana PI foi observado um infiltrado inflamatório moderado de distribuição difusa na derme com moderado parasitismo e ausência da necrose. Na 8ª semana PI foi caracterizado um infiltrado inflamatório intenso formado principalmente por células mononucleares moderadamente parasitadas, linfócitos e poucos polimorfonucleares, distribuídos em caráter difuso pelo tecido dérmico. A necrose era discreta e focal (Figura 14 – de D a F).

Figura 14 – Aspecto histopatológico da pele de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (V.) shawi*. A - aos 30 dias PI, o infiltrado inflamatório era discreto e difuso pela derme (aumento de 200x, coloração em H&E); B - baixa densidade de células polimorfonucleares aos 30 dias PI (asterisco, aumento de 400x, coloração em H&E); C – baixa densidade de formas amastigotas aos 30 dias PI (seta, aumento de 400x, imunomarcção de formas amastigotas). D - aos 60 dias PI houve um intenso infiltrado inflamatório difuso pela derme com presença de discreta necrose tecidual (aumento de 400x, coloração em H&E); E – presença de baixas densidades de polimorfonucleares aos 60 dias PI (asterisco, aumento de 400x, coloração em H&E); F - moderada densidade de formas amastigotas aos 60 dias PI (seta, aumento de 400x, imunomarcção de formas amastigotas).

A análise dos linfonodos dos camundongos da linhagem C57BL/6 também mostrou alterações e parasitismo. Na 2ª semana PI foi observada discreta ativação de folículos linfóides, sem evidência de formas amastigotas do parasito. À 4ª semana PI foi observado que os folículos se apresentavam maiores em relação aos animais infectados por 2 semanas, com um parasitismo ainda ausente e presença de poucos neutrófilos na região capsular. Na 6ª semana PI havia um maior número de folículos ativados e o parasitismo pôde ser observado tanto na região medular como próximo a cápsula do linfonodo (Figura 15 A, B e C). Na 8ª semana PI foi observado a presença de macrófagos com parasitos tanto na região medular como capsular do órgão, e os folículos linfóides apresentavam centros germinativos mais ativados (Figura 15 D, E e F).

Os linfonodos dos animais controle, em todos os períodos experimentais, não apresentaram alterações histológicas.

Figura 15 - Aspecto histopatológico de linfonodos dos camundongos C57BL/6 infectados com *L. (V.) shawi*. A - aos 45 dias PI, foi observado uma maior ativação dos folículos linfóides (seta, aumento de 400x, coloração em H&E); B - espessamento da cápsula com a presença de polimorfonucleares aos 45 dias PI (asteriscos, aumento de 400x, coloração em H&E); C - na região medular também foi encontrado células infectadas aos 45 dias PI (seta, aumento de 400x, imunomarcacão de formas amastigotas). D - aos 60 dias PI foi observado uma maior ativação dos folículos linfóides (seta, aumento de 100x, coloração em H&E); E - maior espessamento da cápsula com presença de polimorfonucleares aos 60 dias PI (asterisco, aumento de 400x, coloração em H&E); F - na região medular maior parasitismo foi verificado aos 60 dias PI (seta, aumento de 400x, imunomarcacão de formas amastigotas).

4.2.2.3 - Análise da resposta imune humoral

Os níveis de IgG total (figura 16 A) e IgG1 (figura 16 B) nos camundongos BALB/c infectados estiveram aumentados significativamente a partir da 2ª semana PI e aumentaram com a evolução da infecção em comparação aos animais saudáveis ($p < 0.05$). Os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram aumento significativo dos níveis de IgG total e IgG1 na 6ª e 8ª semanas PI em comparação aos animais saudáveis ($p < 0.05$). Comparativamente, os camundongos BALB/c produziram significativamente mais IgG total anti-*Leishmania* do que os C57BL/6 ($p < 0.05$), nas ordens de 1,5 vezes na 4ª semana PI, 2,0 vezes na 6ª semana PI e 5,0 vezes na 8ª semana PI para IgG total; para IgG1 estes aumentos foram de 4,0 vezes na 4ª semana PI; de 3,2 vezes na 6ª semana PI e de 9,1 vezes na 8ª semana PI. Tais camundongos produziram níveis de IgG2a e IgG2b similares aos seus respectivos grupos saudáveis (dados não mostrados).

Figura 16 – Níveis de IgG total (A) e IgG1 (B) anti-leishmania nos soros dos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados ou saudáveis. * e ** $p < 0.05$ indicam que os níveis de IgG total e IgG1 anti-leishmania produzidos pelos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados diferiram significativamente em relação aos camundongos BALB/c e C57BL/6 saudáveis, respectivamente; † $p < 0.05$ indica que os níveis de IgG total e IgG1 dos camundongos BALB/c diferiram significativamente em comparação aos dos camundongos C57BL/6.

4.3 – Imunizações experimentais

4.3.1 – Imunização com antígeno secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi*

4.3.1.1 – Purificação das frações protéicas

O sobrenadante de cultura das formas promastigotas (nomeado como proteína secretada/excretada) apresentaram antígenos de alta, intermediária e baixa MMs, como verificado através de eletroforese (figura 17 A). Para verificar se os antígenos seriam reconhecidos por soros de camundongos cronicamente infectados com *L. (V.) shawi* foi feita a transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose, e as análises realizadas utilizando soros de camundongos cronicamente infectados com *L. (V.) shawi* demonstraram que algumas das proteínas detectadas na eletroforese também foram visualizadas no *western blotting*, (figura 17 B). Após estas análises, as proteínas secretadas/excretadas totais foram purificadas de acordo com a sua faixa de MM através de eletroeluição. Tais amostras foram submetidas à nova eletroforese para verificar seu perfil e analisar a presença de proteínas em cada uma das frações. O diagrama esquemático da figura 16 C mostra este perfil eletroforético de cada uma das frações obtidas e utilizadas para imunizar os camundongos da linhagem BALB/c.

Figura 17 – Eletroforeses e *Western blotting* das proteínas totais secretadas por formas promastigotas de *L. (V.) shawi* (A e B). A imagem C representa o gel obtido e corado com prata das frações purificadas a partir das proteínas totais secretadas das formas promastigotas de *L. (V.) shawi*. MM – massa molecular. Marcador molecular – kDa.

4.3.1.2 – Tamanho de lesão e carga parasitária

Os animais que foram imunizados com a fração de alta MM apresentaram tamanho de lesão similar aos animais infectados em todos os períodos experimentais (figura 18), porém, a imunização com as frações de intermediária e baixa MMs inibiu significativamente ($p < 0,05$) a progressão da lesão de pele nos animais após o desafio com formas promastigotas a partir da 4ª semana PD, sendo que na 6ª semana PD houve uma inibição significativa do tamanho da lesão de 2,0 e 3,3 vezes, nos grupos que foram imunizados com as frações de intermediária e baixa MMs, respectivamente, em comparação ao grupo infectado ($p < 0,05$).

Figura 18 – Evolução da lesão nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0.05$ indica que o tamanho da lesão diferiu significativamente nos grupos que foram imunizados com os antígenos de intermediária e baixa MM em comparação aos animais infectados; † $p < 0.05$ indica que o tamanho de lesão dos grupos experimentais diferiram significativamente em relação ao grupo saudável. MM – massa molecular.

Em comparação ao grupo infectado, a imunização com as frações de média e baixa MMs inibiram o crescimento parasitário na pele em 3,5 e 14,7 vezes, respectivamente ($p < 0.05$), entretanto os animais imunizados com a fração de alta massa molecular tiveram uma carga parasitária similar ao do grupo infectado (figura 19).

Figura 19 - A carga parasitária foi determinada na pele dos grupos experimentais através de diluição limitante. * $p < 0.05$ indica que a carga parasitária dos grupos que foram imunizados com as frações de média e baixa MM diferiram significativamente em comparação com a do grupo infectado. MM – massa molecular.

4.3.1.3 – Análise da resposta imune celular

A análise da resposta imune celular nos grupos que foram imunizados com as diferentes frações protéicas secretadas/excretadas foi realizada na 6ª semana PD.

Em comparação aos animais infectados, os animais que foram imunizados com a fração de alta MM e posteriormente desafiados apresentaram aumento significativo de 37,0 vezes na expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4⁺, contudo uma supressão significativa de 9,3 vezes na expressão desta citocina foi verificada nos linfócitos T CD8⁺ em comparação às respectivas subpopulações celulares dos animais infectados. Não houve alteração significativa na expressão de IFN- γ nas células dnCD4CD8 (figura 20 A). Este grupo também apresentou uma inibição significativa da

expressão de IL-4 nos linfócitos T CD8⁺, na ordem de 1,5 vezes ($p < 0.05$) em relação aos linfócitos T CD8⁺ do grupo infectado. As outras subpopulações celulares expressaram níveis similares de IL-4 em comparação às subpopulações do grupo infectado (figura 20 B).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e as células dnCD4CD8 dos animais que foram imunizados com a fração de média MM e posteriormente desafiados apresentaram aumento significativo da expressão de IFN- γ em cerca de 20; 2,3 e 11,6 vezes, respectivamente ($p < 0.05$) em relação às subpopulações celulares do grupo infectado (figura 20 A). Além disso, ambas as populações de linfócitos T deste grupo experimental apresentaram aumento significativo da expressão de IL-4, na ordem de 13,4 e 8,9 vezes ($p < 0.05$), por outro lado, a expressão desta citocina esteve inibida significativamente ($p < 0.05$) nas células dnCD4CD8 em cerca de 14,2 vezes em comparação às respectivas subpopulações celulares do grupo infectado (figura 20 B).

No grupo que foi imunizado com a fração de baixa MM e posteriormente desafiado, foi visto que os linfócitos T CD4⁺ e as células dnCD4CD8 apresentaram aumento significativo na expressão de IFN- γ na ordem de 20,1 e 10,3 vezes, respectivamente, em relação às mesmas subpopulações celulares do grupo infectado ($p < 0.05$). Além disso, inibição significativa ($p < 0.05$) na expressão de IFN- γ foi verificada na ordem de 184,3 vezes em relação à expressão de IFN- γ dos linfócitos T CD8⁺ dos animais infectados (figura 20 A). Por sua vez, os níveis de IL-4 (figura 20 B) esteve significativamente aumentado em 2 vezes nos linfócitos T CD4⁺ ($p < 0.05$), contudo houve supressão significativa da expressão desta citocina

nos linfócitos T CD8⁺ e nas células dnCD4CD8 em 1,5 e 6,7 vezes, respectivamente ($p < 0.05$).

Figura 20 – A expressão de IFN-γ (A) e IL-4 (B) foi estudada nos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e nas células dnCD4CD8 dos diferentes grupos experimentais. *, ** e *** p < 0.05 indicam que a expressão de citocinas dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e dnCD4CD8 dos grupos desafiados diferiu significativamente em comparação às respectivas populações celulares do grupo infectado. dn – duplo negativas; MM – massa molecular; LT – linfócito T; HPRT – hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*).

4.3.2 - Imunização com antígeno solúvel das formas amastigotas e promastigotas de *L. (V.) shawi*

4.3.2.1 - Tamanho de lesão e carga parasitária

As imunizações com os antígenos solúveis induziram diferentes respostas durante a evolução da infecção (figura 21).

Em comparação ao grupo saudável, o imunizado com antígeno solúvel das formas amastigotas (grupo AgAma) apresentou significativo crescimento de lesão a partir da 1ª semana pós desafio (PD) ($p < 0.05$). Este grupo apresentou similar tamanho de lesão de pele com os animais infectados até a 4ª semana PD. Na 5ª e 6ª semana PD, foi verificado que houve um aumento da lesão nos camundongos submetidos à imunização com AgAma, nas ordens de 1,4 e 1,6 vezes em comparação ao grupo infectado ($p < 0.05$).

Em comparação aos animais saudáveis, o grupo AgPro apresentou aumento significativo do tamanho de lesão apenas na 5ª e 6ª semanas PD. Por outro lado, esta imunização protegeu os animais, uma vez que o tamanho de lesão foi reduzido significativamente em 2,2 vezes ($p < 0.05$) comparado ao grupo infectado na 6ª semana PD (figura 21).

Figura 21 – Evolução de lesão nos grupos AgAma, AgPro, Infectados e Saudáveis. * e ** $p < 0.05$ indicam que o tamanho da lesão dos grupos AgAma e AgPro diferiram significativamente em relação aos animais infectados; # $p < 0.05$ indica que o tamanho de lesão dos grupos experimentais diferiram significativamente em relação ao grupo saudável.

O grupo submetido à imunização com AgAma apresentou aumento significativo da carga parasitária na pele e linfonodos em 5,4 e 2,5 vezes, respectivamente ($p < 0.05$). Por outro lado, os animais que foram imunizados com AgPro apresentaram diminuição significativa da carga parasitária na pele em 3,7 vezes, comparado ao grupo infectado ($p < 0.05$), entretanto não houve modificação da carga parasitária nos linfonodos nestes animais em relação aos infectados (figura 22).

Figura 22 – Análise da carga parasitária dos grupos AgAma, AgPro e Infectados foi determinada na pele e em linfonodos popliteais através de diluição limitante. * $p < 0.05$ indica que a carga parasitária na pele dos grupos AgAma e AgPro diferiu significativamente em relação a carga parasitária dos animais infectados.

4.3.2.2 – Análise da resposta imune celular

A resposta imune celular foi analisada através da produção de citocinas pelas células extraídas dos linfonodos popliteais dos diferentes grupos experimentais.

A imunização com AgAma inibiu a produção de IL-2 e IL-4 produzido pelas células dos linfonodos popliteais sob estímulo com antígeno total ($p < 0.05$) em 8,2 e 17,1 vezes comparado com as células de linfonodos estimuladas com antígeno total do grupo infectado. Por outro lado, houve o aumento de TGF- β , citocina esta que não foi detectada nos animais infectados (figura 23). Além disso, esta imunização bloqueou a produção de IFN- γ e IL-10.

Por outro lado, a imunização com o AgPro induziu aumento significativo dos níveis de IFN- γ em 1,6 vezes em relação à produção das células dos animais infectados ($p<0.05$). Importaneamente, as células dos animais submetidos a esta imunização foram capazes de produzir IL-12, mas também TGF- β , duas citocinas que não foram detectadas nas células estimuladas dos animais infectados ($p<0.05$). Adicionalmente, tais células produziram 7,3 vezes menos IL-4 que o grupo infectado. Níveis de IL-10 não foram detectados ($p<0.05$).

As células não estimuladas dos grupos diferentes grupos experimentais não produziram citocinas. Similarmente, células extraídas dos animais saudáveis estimuladas ou não com o antígeno total também não produziram citocinas. Nestes grupos não foi detectado TNF- α sob nenhuma condição experimental.

Figura 23 – Concentração de citocinas foi determinada no sobrenadante de cultura de células extraídas de linfonodos dos diferentes grupos experimentais e estimuladas com o antígeno total das formas promastigotas de *L. (V.) shawi*. * e ** $p < 0.05$ indica que a produção de IFN- γ e IL-12 pelas células de linfonodos estimuladas diferiu significativamente do grupo infectado; † e †† $p < 0,05$ indica que a produção de IL-4 e IL-2 pelas células de linfonodos estimuladas diferiu significativamente em comparação às do grupo infectado.

4.3.2.3 – Análise da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada no soro dos diferentes grupos experimentais. A figura 24A mostra os níveis de IgG total anti-*Leishmania* em resposta a imunização com o AgAma. Tais dados revelaram que em relação aos animais saudáveis, o grupo infectado e AgAma apresentou aumento significativo dos níveis de IgG total anti-*Leishmania* ($p < 0,05$), entretanto, o grupo AgAma apresentou aumento significativo nos níveis de

IgG total em relação aos animais infectados em 1,4 vezes ($p < 0,05$). Similarmente, os níveis de IgG total anti-*Leishmania* dos grupos infectados e AgPro (figura 24 B) foram significativamente maiores em comparação aos animais saudáveis ($p < 0,05$), mas, o grupo AgPro apresentou significativa diminuição dos níveis de IgG total em relação aos animais infectados, em uma ordem de 1,6 vezes ($p < 0,05$).

Figura 24 – Análise da resposta imune humoral nos soros dos diferentes grupos experimentais. A) Níveis de IgG total anti-*Leishmania* do grupo AgAma. B) Níveis de IgG total anti-*Leishmania* do grupo AgPro. * $p < 0,05$ indica que os níveis de IgG total anti-*Leishmania* diferiram significativamente em comparação ao grupo infectado. † $p < 0,05$ indica que os níveis de IgG total anti-*Leishmania* dos grupos experimentais diferiram significativamente do grupo saudável.

4.3.3 – Análise da proteção induzida pelos antígenos protéicos purificados a partir do antígeno solúvel das formas promastigotas de *L. (V.) shawi*

4.3.3.1 – Purificação das frações protéicas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC de fase reversa) e análises bioquímicas e bioinformáticas

A purificação do antígeno solúvel das formas promastigotas de *L. (V.) shawi* foi efetuado utilizando HPLC de fase reversa, usando 280nm como comprimento de onda (figura 25 A).

Através de tal metodologia foi possível purificar cinco frações protéicas e nomeadas como F1, F2, F3, F4 e F5. Logo após obtenção, estas frações foram liofilizadas e submetidas à eletroforese (figura 25 B). Neste caso, a fração F1 não foi detectada utilizando coloração com prata, entretanto, foi possível verificar o padrão de proteínas das outras frações, onde a F2 apresentou proteínas entre 29 e 24 kDa, a F3 entre 55 e 24 kDa, as frações F4 e F5 apresentaram proteínas abaixo de 24 kDa.

Figura 25 – Purificação do antígeno solúvel das formas promastigotas por HPLC de fase reversa (A). Diagrama representativo do perfil eletroforético das frações protéicas obtidas em HPLC de fase reversa (B). Marcador molecular – kDa.

Além da eletroforese convencional, foi feito um gel de tricina na tentativa de analisar a faixa de MM do antígeno F1, contudo neste gel

também não foi possível detectar bandeamento de proteínas após coloração com prata (dados não mostrados). Por esta razão, este antígeno foi submetido à espectrometria de massas.

Esta análise permitiu a identificação de 67 diferentes fragmentos de proteínas, sendo que após consulta no banco de dados “Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi possível identificar alguns destes fragmentos (tabela II). Entre eles, 33 antígenos apresentaram 100% de identidade com antígenos pertencentes a *L. (V.) braziliensis*, 16 antígenos apresentaram 100% de identidade com os de *L. infantum*, 10 antígenos apresentaram 100% de identidade com os de *L. major*, 7 antígenos tiveram 100% de identidade com os de *L. (L.) mexicana* e apenas 1 com *L. donovani*.

Tabela II – A tabela mostra as sequências de aminoácidos adquiridas no espectrometro de massas, a identificação de tais sequências conjuntamente com seu código de acesso no BLAST, bem como a porcentagem de identidade do antígeno de *L. (V.) shawi* com a de outras espécies já depositadas no banco de dados.

Sequência adquirida*	Identificação (código de acesso)	Parasito	Identidade (%)
SEEAGGSAASAKVNC	Cadeia curta da dehidrogenase (XP_001568225.1)	<i>L. infantum</i>	100
KKNQAAPAEQTVRL	Proteína ribossomal s20 (XP_001566139.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
SVADITNSV	Alfa tubulina (XP_001566612.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
KEDAANNYAR	Alfa tubulina (XP_001563163.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
FEEDGNFE	Proteína hipotética (XP_001566360.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
FDESPFP	β -galactofuranosil glicosil transferase (XP_001564335.1)	<i>L. braziliensis</i>	64
EEVEEEE	Proteína hipotética (XP_001566489.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
AGYLIHSGAVSS	Proteína hipotética (XP_001566489.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
RNAGALR	Proteína hipotética (XP_001564809.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
FFTGQEE	Helicase <i>dead/h</i> (XP_001568924.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
HISGELQ	Fosfolípídeo transportador da proteína ATPase-like (XP_001562679.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
NAAPKSSGTKADTVR	Proteína hipotética 4 (XP_001563405.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
EAMAHGYR	Subunidade da proteína vacuolar ATPase like (XP_001561928.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
GGEINAKG	Proteína <i>zinc-finger</i> ZPR (XP_001563921.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
EAQPGDNVG	Fator de alongação 1 α (XP_001563777.1)	<i>L. braziliensis</i>	100

NNNGDIVN	Polipetídeo nascente associado à subunidade do complexo cópia 1	<i>L. donovani</i>	100
	<i>like</i> (CBZ31415.1)		
PAGLVAAEPR	Proteína hipotética (XP_001467027.1)	<i>L. infantum</i>	100
AGMTSARQPSQFSLT	Proteína hipotética (XP_001562346.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
QGDIPNA	Proteína hipotética (XP_001683088.1)	<i>L. major</i>	100
KPTVVLHHSPW	Proteína hipotética (XP_001569257.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
KPSQNGNYVATGGI	Dineína (XP_001567473.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
QDSSGSPTHVDLSSSSS	Proteína quinase inositol polifosfato <i>like</i> (XP_001687633.1)	<i>L. major</i>	100
VG			
YTEDLK	Proteína hipotética (CBZ25880.1)	<i>L. mexicana</i>	100
EGDGAALVHL	Proteína fosfonopiruvato decarboxilase (CBZ28529.1)	<i>L. mexicana</i>	100
SRVLSMSDASPK	Proteína quinase (XP_001684321.1)	<i>L. major</i>	100
FFMEMFVVPL	Proteína hipotética (XP_001566616.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
AAPAEQRTR	Proteína hipotética (XP_001682227.1)	<i>L. major</i>	100
AFDEKKN	ATPase <i>like</i> (CBZ28930.1)	<i>L. mexicana</i>	100
KDVEGAPSKKR	Proteína hipotética (XP_001470535.1)	<i>L. infantum</i>	100
GIITEVTLE	L-gulonolactona oxidase (XP_001464804.1)	<i>L. infantum</i>	100
AGLTNDNAGDGTSTA	Chaperonin Hsp60, precursora mitocondrial (CAM42998.2)	<i>L. braziliensis</i>	100
QSTVTSPWPAAP	Helicase ATP-dependent (XP_001465982.1)	<i>L. infantum</i>	100
ALQLLTQMHO	Proteína hipotética (XP_001567022.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
EQEKEHKMFLQK	Proteína hipotética (XP_001566994.1)	<i>L. braziliensis</i>	100

ASSKDFMRFY	Quinesina (XP_001467156.1)	<i>L. infantum</i>	100
QRQAIVGG	Transportador ABC (XP_001463924.1)	<i>L. infantum</i>	100
GEAAATAVSMAY	Proteína hipotética (XP_001563144.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
EGGVMLSH	Cisteíno peptidase (XP_001565070.1)	<i>L. infantum</i>	100
EHETPGAEAA	Proteína hipotética (XP_001680850.1)	<i>L. major</i>	100
ASGPSTSARVNSVR	Proteína hipotética (XP_001569024.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
KPASSPTHPPHPLPHV	Proteína hipotética (XP_001687333.1)	<i>L. major</i>	100
NVNTVVLTG	Proteína hipotética (CBZ24366.1)	<i>L. mexicana</i>	100
LVQRISMN	Proteína hipotética (CAB71235.1)	<i>L. major</i>	100
RVAYGAS	Transcriptase reversa telomerase (XP_001469622.1)	<i>L. infantum</i>	100
DRFDATLNK	Proteína hipotética (XP_001563929.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
MFLSPSNAGGG	Protein phosphatase 2C-like (XP_001563376.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
AACCCAPLLSAS	Proteína hipotética (CBZ28153.1)	<i>L. mexicana</i>	91
KSKAQAMNERP	Cadeia pesada da dineína (XP_001470442.1)	<i>L. infantum</i>	100
TPQVSPIN	Proteína hipotética (XP_001463831.1)	<i>L. infantum</i>	100
PVRAGPGGG	Proteína hipotética (CBZ29607.1)	<i>L. mexicana</i>	100
RTFAPPPTG	Proteína hipotética (XP_001466453.1)	<i>L. infantum</i>	88
GDDDAQRKRHHSNHFGL	Proteína hipotética (CAM67008.2)	<i>L. infantum</i>	68
GG			
IGKVTKDISA	Proteína hipotética (XP_001562498.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
YVEMVPR	Transportador de glicose (CBZ26490.1)	<i>L. mexicana</i>	100

SSQPVSLYSVT	Proteína transportadora sec31 (XP_001681582.1)	<i>L. major</i>	100
RGRAPAASN	Proteína hipotética (XP_001562957.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
TTALSPRKTAEEER	Proteína hipotética (CAM68929.2)	<i>L. infantum</i>	100
MRGDGGYGP	Proteína hipotética (XP_001683017.1)	<i>L. infantum</i>	100
RGTNVVSPAS	Proteína hipotética (XP_001568247.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
SGTLEVQTKTN	Mio-inositol-1(or 4)-monofosfatase (XP_001563919.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
HKAPPMV	Proteína hipotética (X XP_001683215.1)	<i>L. major</i>	100
TVLHMAGGST	Proteína hipotética (XP_001561744.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
TPKKIAGAS	Cadeia pesada da dineína (CAM43859.2)	<i>L. braziliensis</i>	100
YTGHAGATRR	Proteína hipotética (XP_001563774.1)	<i>L. braziliensis</i>	100
HDKVVKKGHSA	Proteína hipotética (XP_001463402.1)	<i>L. infantum</i>	100
MEACMTS	Proteína hipotética (XP_001685684.1)	<i>L. major</i>	100
TVLAGLEKSAS	Proteína hipotética (XP_001683585.1)	<i>L. major</i>	81
VFVVYN	Proteína hipotética (CAM42931.2)	<i>L. braziliensis</i>	100

* Destacado em vermelho estão os peptídeos capazes de se ligar a MHC-I e/ou MHC-II através de análises de bioinformática.

Como ilustra a figura 26, destes 67 fragmentos, a grande maioria, cerca de 77%, não apresentou nenhuma função relatada anteriormente, sendo, portanto, alvos em potencial para pesquisas futuras. Mas 9% deles estiveram relacionados à fisiologia, 6% a imunidade, 3% à patologia e nutrição e apenas 2% relacionados à resistência a fármacos.

Figura 26 – A fração F1 foi submetida à espectrometria de massas e 67 fragmentos foram detectados em tal amostra, sendo 77% sem função específica.

Utilizando o site PredBALB foi possível realizar uma predição de quais peptídeos seriam capazes de se ligar às moléculas de MHC-I e MHC-II. Neste caso, foi possível triar 37 dos 67 peptídeos, sendo que cerca de 51,3% seriam capazes de se ligar a ambas as moléculas de MHC-I e MHC-II, 8,1% apenas às de MHC-I e 40,5% apenas às de MHC-II (figura 27).

Figura 27 – Dos 67 peptídeos encontrados em F1 apenas 37 deles foram capazes de se ligar a MHC-I, MHC-II ou ambos como predito no site no site PredBALB.

Em adição, foi possível prever que cerca de 10,8% dos peptídeos seriam capazes de se ligar aos alelos de MHC-II, enquanto apenas 2,7% destes antígenos poderiam se ligar a dois dos três alelos codificadores da molécula de MHC-I dos camundongos BALB/c.

4.3.3.2 – Tamanho de lesão e carga parasitária

Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com as frações protéicas purificadas por HPLC de fase reversa e em seguida estes animais foram desafiados na pata direita com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento.

A imunização com as frações F1 e F5 induziu proteção na pele dos animais desafiados, sendo que houve inibição significativa do crescimento

da lesão desde a 2ª semana PD até a 8ª em relação ao grupo infectado ($p < 0,05$). Na 8ª semana PD, os animais que foram imunizados com F1 apresentaram uma inibição do tamanho da lesão de 3,3 vezes e o grupo imunizado com F5 de 1,8 vezes em relação ao infectado (figura 28 A). Além disso, estes grupos apresentaram aumento significativo do tamanho da lesão em relação aos animais saudáveis a partir da 5ª semana PD.

A imunização com F2 não alterou o curso da infecção, entretanto, a imunização com F3 e F4 induziu aumento significativo do tamanho da lesão na 6ª e 8ª semanas PD em comparação aos animais infectados ($p < 0,05$), e na 8ª semana os grupos imunizados com F3 e F4 apresentaram aumento no tamanho de lesão na ordem de 1,6 e 1,7 vezes em comparação aos animais infectados (figura 28 B). Ainda em comparação aos animais saudáveis os grupos F2, F3, F4 e infectado apresentaram aumento significativo do tamanho de lesão a partir da 2ª semana PD ($p < 0,05$).

Figura 28 – Evolução da lesão nos diferentes grupos experimentais. A – animais imunizados com F1 e F5. B - animais imunizados com F2, F3 e F4. * $p < 0.05$ indica que o tamanho da lesão dos grupos imunizados diferiu significativamente do grupo infectado; † $p < 0.05$ indica que o tamanho de lesão dos grupos experimentais diferiram significativamente em relação ao grupo saudável.

Em relação à carga parasitária, foi verificado que os animais imunizados com F1 apresentaram uma diminuição da carga parasitária de 8,5 vezes na pele e 15,5 vezes nos linfonodos em comparação às respectivas cargas parasitárias da pele e linfonodos popliteos dos animais infectados ($p<0.05$). A fração F5 inibiu em 9,5 vezes a progressão parasitária na pele dos animais imunizados comparado à carga parasitária da pele dos animais infectados ($p<0.05$), contudo não houve proteção nos linfonodos popliteais neste grupo em relação ao grupo infectado (figura 29 A). A imunização com a fração F2 não modificou a carga parasitária na pele e linfonodos popliteais (figura 29 B). Por outro lado, a imunização com as frações F3 e F4 facilitou a multiplicação parasitária na pele, em cerca de 2,3 e 4,6 vezes em comparação ao grupo infectado ($p<0.05$). Não houve alteração significativa da carga parasitária nos linfonodos popliteais dos grupos que foram imunizados com as frações F3 e F4 (figura 29 B).

Figura 29 – As cargas parasitárias dos diferentes grupos experimentais foram quantificadas em pele e linfonodo popliteal. A – carga parasitária dos grupos F1, F5 e infectados. B – carga parasitária dos grupos F2, F3, F4 e infectados. * $p < 0.05$ indica que a carga parasitária dos grupos imunizados diferiu significativamente do grupo infectado.

4.3.3.3 – Análise da resposta imune celular

A resposta imune celular foi avaliada através da produção de citocinas em sobrenadante de cultura em células de linfonodos popliteos estimuladas com o AgT de formas promastigotas de *L. (V.) shawi* (figura 30) ou com a respectiva fração protéica (figura 30), que foi utilizada para imunizar os animais experimentais.

As células extraídas dos animais imunizados com a fração F1 e estimulados com o AgT apresentaram aumento significativo de IFN- γ e IL-10 (figuras 30 A e 30 D) de 1,4 e 2,0 vezes, respectivamente, em relação ao grupo infectado ($p<0.05$). Por outro lado, a produção de IL-4 (figura 30 C) mostrou-se suprimida em 4,6 vezes nestas células em comparação aos animais infectados ($p<0.05$). O nível de IL-2 foi similar às células dos animais infectados (figura 30B).

As células extraídas dos animais que foram imunizados com a fração F2 apresentaram diminuição significativa dos níveis de IFN- γ , IL-2 e IL-4 na ordem de 1,9; 1,6 e 3,2 vezes em relação ao grupo infectado (figuras 30 A, B e C). Por outro lado, houve aumento significativo dos níveis de IL-10 (figura 30 D) em 1,8 vezes em relação ao grupo infectado ($p<0,05$).

As células dos linfonodos animais que foram imunizados com as frações F3 e F4 apresentaram um perfil muito similar de produção de citocinas após estimulação com AgT. Nestes grupos foi verificado um aumento significativo dos níveis de IFN- γ nas ordens de 1,5 para F3 e 1,7 vezes para F4, de IL-4 nas ordens de 3,7 vezes para F3 e 3,8 vezes para F4

e por fim de IL-10 nas ordens de 6,1 vezes para F3 e 6,2 vezes para F4, em comparação aos animais infectados ($p<0,05$). Nestes grupos, os níveis de IL-2 mostraram-se diminuídos em 2,8 e 3,2 vezes nos grupos F3 e F4 em comparação aos animais infectados ($p<0,05$), respectivamente (figuras 30 A, B, C e D).

As células dos linfonodos dos animais que foram imunizados com F5 mostraram aumento significativo na produção de IFN- γ (figura 30 A), IL-4 (figura 30 C) e IL-10 (figura 30 D) nas ordens de 1,4; 3,6 e 5,3 vezes em comparação aos animais infectados, respectivamente ($p <0,05$). Os níveis de IL-2 (figura 30 B) foram similares ao grupo infectado. Células não estimuladas não produziram citocinas em resposta ao AgT. Não foram detectadas IL-12, TNF- α e TGF- β .

Figura 30 – A produção de IFN- γ (A), IL-2 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) foi quantificada no sobrenadante de células extraídas de linfonodos popliteais dos diferentes grupos experimentais que foram estimuladas com AgT. * $p<0.05$ indica que a produção de citocinas dos grupos que foram imunizados diferiu significativamente do grupo infectado.

As células dos grupos submetidos à imunização as do grupo infectado foram estimuladas com as suas respectivas frações antigênicas.

Neste caso, as células extraídas dos linfonodos dos animais imunizados com F1 e estimuladas com a mesma fração produziram significativamente mais IFN- γ (figura 31 A) e IL-10 (figura 31 B) em comparação às células estimuladas com F1 do grupo infectado na ordem de 12,8 e 28,3 vezes, respectivamente ($p < 0.05$). Além disso, foi possível detectar IL-4 nas células estimuladas do grupo F1, enquanto que as células estimuladas do grupo infectado não produziram esta citocina. Os níveis de IL-2 (figura 30 B) mostraram-se similares ao grupo infectado.

As células que foram extraídas dos linfonodos dos animais imunizados com F2 e estimuladas com a mesma fração, produziram significativamente mais IFN- γ (figura 31 A) e IL-10 (figura 31 B) em comparação às células estimuladas com F2 do grupo infectado na ordem de 2,9 e 18,7 vezes, respectivamente ($p < 0.05$). Também foi possível detectar IL-4 (figura 31 C) nas células estimuladas do grupo F1, enquanto que nas células estimuladas do grupo infectado não houve detecção desta citocina. Os níveis de IL-2 (figura 31 B) foram similares com o grupo infectado.

As células que foram extraídas dos linfonodos dos animais imunizados com F3 e estimuladas com a mesma fração produziram significativamente mais IL-4 (figura 31 C) e IL-10 (figura 31 D) em comparação às células estimuladas com F3 do grupo infectado, na ordem de 9,8 e 6,1 vezes ($p < 0.05$). A produção de IL-2 (figura 31 B) esteve suprimida nas células do grupo F3 em comparação às células dos animais infectados, na ordem de

1,7 vezes ($p<0.05$). Os níveis de IFN- γ produzido pelas células do grupo que foi imunizado com F3 foi similar ao do grupo infectado.

As células extraídas dos animais imunizados com F4 e estimuladas com a mesma fração produziram significativamente mais IFN- γ (figura 31 A) e IL-10 (figura 31 D) em comparação às células estimuladas com F4 do grupo infectado, na ordem de 2,7 e 33,7 vezes, respectivamente ($p<0.05$). Nas células estimuladas do grupo que foi imunizado com F4 houve produção significativa de IL-4 (figura 31 C), enquanto nas células estimuladas dos animais infectados não houve detecção desta citocina. Os níveis de IL-2 (figura 31 B) foram similares entre os grupos estimulados com a fração F4.

As células extraídas dos animais imunizados com F5 e estimuladas com a mesma fração produziram significativamente mais IFN- γ (figura 31 A), IL-2 (figura 31 B) e IL-10 (figura 31 D) em comparação às células estimuladas com F5 do grupo infectado, na ordem de 1,9; 1,6 e 10,2 vezes ($p<0.05$). Nas células do grupo que foi imunizado com F5 também houve aumento da produção de IL-4 (figura 31 C), porém sem detecção desta citocina nas células estimuladas do grupo infectado.

Neste grupo de experimentos IL-12, TNF- α e TGF- β não foram detectados.

Figura 31 – A produção de IFN- γ (A), IL-2 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) foi quantificada no sobrenadante de células extraídas de linfonodos popliteais dos diferentes grupos experimentais estimuladas com suas respectivas frações protéicas. * $p < 0.05$ indica que a produção de citocinas das células pertencentes aos grupos desafiados diferiu significativamente daquele do grupo infectado.

4.3.3.4 – Análise da resposta humoral

Foi analisada a resposta de IgG total anti-*Leishmania* (figura 32 A), bem como os principais isótipos circulantes nos grupos experimentais (figura 32 B). Os resultados mostraram que todos os grupos experimentais que foram inoculados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento apresentaram aumento significativo de IgG total, IgG1 e IgG2a em relação ao grupo saudável ($p < 0.05$). Porém, os animais imunizados com as frações proteicas F3, F4 e F5 mostraram níveis mais elevados que os imunizados com F1, F2 e só infectados ($p < 0.05$).

Os animais que foram imunizados com F1 apresentaram níveis similares de IgG total anti-*Leishmania* (figura 32 A) ao do grupo infectado, sendo a principal alteração relacionada a diminuição significativa do isótipo IgG1 em 1,3 vezes ($p<0.05$) e aumento de 1,8% do isótipo IgG2a (figura 32 B) em comparação aos animais infectados ($p<0.05$).

Os animais submetidos à imunização com F2 apresentaram níveis similares de IgG total, IgG1 e IgG2a com o grupo infectado (figura 32 A e B) .

Por outro lado, os animais que foram submetidos à imunização com as frações F3, F4 e F5 apresentaram aumento significativo de IgG total (figura 32 A) em 1,9; 1,7 e 1,5 vezes comparado ao grupo infectado ($p<0.05$), sendo o principal que houve aumento significativo do isótipo IgG1 (figura 32 B) em 1,6; 1,5 e 1,5 vezes em relação aos animais infectados ($p<0.05$).

Figura 32 – IgG total anti-*Leishmania* (A) e os isótipos IgG1 e IgG2a (B) foram identificados no soro dos grupos experimentais. * $p < 0.05$ indica que a produção de IgG total e IgG1 dos grupos submetidos à imunização diferiu significativamente do grupo infectado. ** $p < 0.05$ indica que a produção de IgG2a dos grupos submetidos à imunização diferiu significativamente do grupo infectado. † $p < 0.05$ indica que a produção de IgG total e IgG1 dos grupos submetidos à imunização e do grupo infectado diferiu significativamente do grupo saudável. †† $p < 0.05$ indica que a produção de IgG2a dos grupos que foram imunizados e do grupo infectado diferiu significativamente do grupo saudável.

4.3.3.5 – Imunofenotipagem de linfócitos

Devido a forte resposta protetora induzida pelo antígeno F1, foram realizadas imunofenotipagem nas células dos linfonodos popliteais dos grupos que foram imunizados com F1, Infectados e Saudáveis.

Foi visto que os grupos imunizado com F1 e infectado apresentaram diminuição significativa de vezes 2,2 e 2,5 vezes na frequência de linfócitos T CD4⁺ e de 1,8 e 2,0 vezes na frequência de linfócitos T CD8⁺ (figura 33) nos linfonodos popliteos comparado ao grupo saudável ($p < 0,05$).

Figuras 33 – Imunofenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos popliteais dos diferentes grupos experimentais. † e †† $p < 0,05$ indica que a frequência relativa de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ diferem significativamente das frequências relativas dos respectivos linfócitos do grupo saudável.

Embora se tenha observado diferenças significativas na população de linfócitos T CD4⁺ nos grupos experimentais, não foi possível encontrar

diferenças significativas na supopulação de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ (figura 34A).

Por outro lado, foi visto que os animais infectados apresentaram uma frequência 1,62 vezes menor de linfócitos T CD8⁺CD62L^{low} que os grupos saudáveis ($p < 0.05$), sendo que a imunização com F1 restaurou os níveis fisiológicos desta subpopulação (figura 34 B), cuja frequência foi 1,63 vezes maior que o grupo infectado ($p < 0.05$).

Figura 34 – A população de linfócitos T $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) dos linfonodos popliteais foi fenotipada para avaliar a expressão do marcador de superfície CD62L. * $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD62L^{low}$ do grupo F1 diferiu significativamente da frequência desta subpopulação presente no grupo infectado; † $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD62L^{low}$ do grupo infectado diferiu significativamente da densidade desta subpopulação presente no grupo saudável.

Todos os linfócitos T CD4⁺ dos diferentes grupos experimentais apresentaram a mesma frequência do marcador CD45RB (figura 35 A).

Contudo, houve diminuição significativa de 1,8 vezes na frequência de linfócitos T CD8⁺CD4⁺CD45RB^{low} do grupo infectado comparado ao grupo saudável ($p<0.05$). A imunização com F1 também pôde restaurar os níveis fisiológicos desta subpopulação no grupo submetido a imunização (figura 35B), cuja frequência foi 1,6 vezes maior que o grupo infectado ($p<0.05$).

Figura 35 – A população de linfócitos T $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) dos linfonodos popliteais foi fenotipada para avaliar a expressão do marcador de superfície CD45RB nos grupos F1, Infectado e Saudável. * $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD45RB^{low}$ do grupo F1 diferiu significativamente da densidade desta subpopulação presente no grupo infectado; † $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD45RB^{low}$ do grupo infectado diferiu significativamente da densidade desta subpopulação presente no grupo saudável.

4.3.4 – Análise da proteção duradoura induzida pelo antígeno F1 purificado das formas promastigotas de *L. (V.) shawi*

Estes experimentos foram realizados objetivando analisar se a imunização com F1 geraria proteção duradoura aos animais experimentais.

4.3.4.1 – Tamanho de lesão e carga parasitária

Após 4 meses da última imunização com F1, os animais submetidos à imunização mantiveram a capacidade de inibir a progressão da lesão desde a 4ª até a 8ª semana PD em comparação aos animais infectados ($p < 0.05$), sendo que nesta última medida experimental houve inibição do tamanho da lesão em 8,7 vezes (figura 36). Houve aumento significativo do tamanho de lesão no grupo F1 - 4 meses a partir da 5ª semana PD em comparação aos animais saudáveis, já no grupo infectado, este aumento ocorreu a partir da 4ª semana ($p < 0.05$).

Figura 36 – O tamanho da lesão foi quantificado em camundongos BALB/c imunizados com F1 e desafiados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento após quatro meses da última imunização. * $p < 0.05$ indica que o tamanho de lesão diferiu significativamente do grupo infectado. † $p < 0.05$ indica que o tamanho de lesão dos grupos F1 – 4 meses e infectados diferiu significativamente do grupo saudável.

Em relação à carga parasitária (figura 37), a imunização com F1 facilitou a eliminação de formas amastigotas intracelulares na pele e nos linfonodos popliteais em 9,6 e 12,1 vezes, respectivamente, em comparação à pele e linfonodos popliteais do grupo infectado ($p < 0.05$).

Figura 37 – Análise da carga parasitária foi avaliada em camundongos BALB/c que foram imunizados com F1 e desafiados com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento após quatro meses da última imunização. * $p < 0.05$ indica que a carga parasitária da pele diferiu significativamente daquela presente no grupo infectado; ** $p < 0.05$ indica que a carga parasitária do linfonodo diferiu significativamente daquela presente no grupo infectado.

4.3.4.2 – Análise da resposta imune celular

Células extraídas dos linfonodos popliteos de ambos os grupos foram estimulados com F1 e AgT, e após 72h a produção de citocinas foi quantificada.

As células do grupo F1 – 4 meses estimulado com F1 e AgT (figura 38 A) apresentaram aumento significativo de IFN- γ na ordem de 2,9 e 4,8 vezes, respectivamente em comparação à produção desta citocina pelas células do grupo infectado estimuladas com ambos os antígenos ($p < 0.05$).

Por outro lado, houve supressão de 7,6 vezes na produção de IL-2 nas células do grupo F1 – 4 meses estimuladas com o AgT comparadas às

células do grupo infectado sob mesma estimulação ($p<0.05$), contudo, as células do grupo F1 – 4 meses estimuladas com F1 produziram níveis de citocinas similares ao das células dos animais infectados (figura 38 B).

Em relação a IL-4, as células do grupo F1 – 4 meses quando estimuladas com F1 produziram tal citocina, mas as células do grupo infectado não. Contudo, quando a estimulação foi feita com AgT, ocorreu uma supressão significativa da produção de IL-4 ($p<0.05$) em 1,6 vezes nas células do grupo F1 – 4 meses em comparação às células estimuladas com AgT do grupo infectado (figura 38 C).

As células do grupo F1 – 4 meses estimuladas com F1 e AgT produziram significativamente mais IL-10 (figura 38 D), nas ordens de 40,5 e 10,6 vezes, respectivamente, comparado às células dos animais infectados sob mesma estimulação ($p<0.05$).

Neste grupo de experimentos IL-12, TNF- α e TGF- β não foram detectados.

Figura 38 – Os níveis de IFN- γ (A), IL-2 (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) foram quantificados no sobrenadante das células extraídas dos linfonodos popliteais e estimuladas com F1 e AgT dos grupos F1 – 4 meses e infectados. * e ** $p < 0.05$ indicam que a produção de citocinas das células extraídas do grupo F1 – 4 meses e estimuladas com F1 ou AgT diferiu significativamente da produção de citocinas das células estimuladas com F1 ou AgT do grupo infectado, respectivamente.

Além disso, as células estimuladas do grupo F1 – 4 meses estimuladas com F1, AgT ou não estimuladas (NE), foram capazes de proliferar em 2,0; 3,0 e 1,9 vezes, respectivamente, em relação às células dos animais infectados estimuladas com F1, AgT ou NE ($p<0.05$). Ainda, as células dos grupos F1 – 4 meses e infectados foram capazes de proliferar significativamente mais ($p<0.05$) sob estimulação ou não em comparação às células estimuladas ou não dos animais saudáveis (figura 39).

Figura 39 – A proliferação das células dos diferentes grupos experimentais foi analisada após estimulação antigênica. *, ** e *** $p<0.05$ indicam que a proliferação das células do grupo F1 – 4 meses estimuladas com F1, AgT ou NE diferiu significativamente da proliferação das células do grupo infectado estimuladas com F1, AgT ou NE, respectivamente; †, †† e ††† $p<0.05$ indicam que a proliferação das células do grupo F1 – 4 meses e infectados estimuladas com F1, AgT ou NE diferiu significativamente da proliferação das células do grupo saudável estimuladas com F1, AgT ou SE, respectivamente.

4.3.4.3 – Resposta imune humoral

Os níveis de IgG1 (figura 40) estiveram aumentados significativamente nos grupos F1 – 4 meses e infectados em comparação ao grupo saudável na ordem de 2,8 e 2,6 vezes ($p < 0.05$). Por outro lado, os níveis de IgG2a esteve aumentado apenas no grupo F1 - 4 meses em comparação aos animais infectados e saudáveis, nas ordens de 3,1 e 3,2 vezes, respectivamente ($p < 0.05$).

Figura 40 – Os isótipos IgG1 e IgG2a foram identificados no soro dos grupos F1 – 4 meses, infectados e saudáveis. ** $p < 0.05$ indicam que a produção de IgG2a do grupo F1 – 4 meses diferiu significativamente daquela do grupo infectado. † e †† $p < 0.05$ indicam que a produção de IgG1 e IgG2a dos grupos F1 – 4 meses e infectado diferiu significativamente do grupo saudável.

4.3.4.4 – Imunofenotipagem de linfócitos

Foi visto que os grupos F1 – 4 meses e infectado apresentaram diminuição significativa de vezes 2,1 e 2,5 vezes na frequência de linfócitos T CD4⁺ ($p<0,05$). Em relação aos linfócitos T CD8⁺ (figura 41), apenas o grupo infectado apresentou diminuição significativa destas células em 2,0 vezes quando comparado ao grupo saudável ($p<0,05$).

Figura 41 – Imunofenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos popliteos dos diferentes grupos experimentais. † e †† $p<0,05$ indica que a frequência relativa de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ diferem significativamente das frequências relativas dos respectivos linfócitos do grupo saudável.

Não foi possível encontrar diferenças significativas entre as subpopulações linfocitárias CD3⁺CD4⁺ caracterizadas a partir do marcador CD62L (figura 42 A).

Contudo, foi visto que a frequência dos linfócitos T CD8⁺CD62L^{low} do grupo F1 - 4 meses (figura 42 B) esteve 2,5 e 1,6 vezes aumentada em relação ao grupo infectado e saudável, respectivamente ($p<0.05$). Além disto, no grupo F1 – 4 meses foi detectado uma diminuição significativa na frequência de linfócitos T CD8⁺CD62L^{high} de 2,1 vezes em relação aos animais infectados e de 1,7 vezes nos saudáveis ($p<0.05$). O grupo infectado apresentou diminuição significativa de 1,6 vezes na frequência dos linfócitos T CD8⁺CD62L^{low} em relação ao grupo saudável ($p<0.05$).

Figura 43 – A população de linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) dos linfonodos popliteais foi fenotipada para avaliar a expressão do marcador de superfície CD62L nos grupos F1 – 4 meses, Infectados e Saudáveis. * e ** p<0.05 indicam que a frequência de células CD3⁺CD8⁺CD62L^{low} e CD3⁺CD8⁺CD62L^{high} do grupo F1 – 4 meses diferiu significativamente da densidade destas subpopulações presente no grupo infectado; † e †† p<0.05 indicam que a frequência de células CD3⁺CD8⁺CD62L^{high} dos grupos experimentais diferiu significativamente da densidade desta subpopulação presente no grupo saudável.

Similarmente ao grupo F1, não houve alterações significativas nas populações de linfócitos T CD4⁺ que expressavam o marcador CD45RB (figura 44 A), sendo as principais alterações relacionadas aos linfócitos T CD8⁺ (figura 44 B).

Porém, houve diminuição significativa de 1,8 vezes na frequência de linfócitos T CD8⁺CD4⁺CD45RB^{low} do grupo infectado comparado ao grupo saudável ($p<0.05$). O grupo F1 – 4 meses apresentou frequências relativas fisiológicas desta subpopulação, mas seus níveis ainda foram maiores que a do grupo infectado, na ordem de 1,4 vezes ($p<0.05$).

Figura 44 – A população de linfócitos T $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) dos linfonodos popliteais foi fenotipada para avaliar a expressão do marcador de superfície CD45RB nos grupos F1 – 4 meses, Infectados e Saudáveis. * $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD45RB^{low}$ do grupo F1 – 4 meses diferiu significativamente da densidade destas subpopulações presente no grupo infectado; † $p < 0.05$ indica que a frequência de células $CD3^+CD8^+CD62RB^{low}$ diferiu significativamente da densidade desta subpopulação do grupo saudável.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

No presente estudo, seriam utilizadas duas espécies para purificar antígenos, a *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, na tentativa de encontrar antígenos protetores contra a infecção por tais parasitos em modelo murino de infecção. Contudo, foi relatado ao nosso grupo de pesquisas que *L. (V.) shawi* poderia possuir antígenos mais eficientes em comparação às outras espécies para despertar respostas imunes celulares, pois foi verificado, em região endêmica para LTA, no norte do Brasil, que alguns pacientes infectados por *L. (V.) shawi* eram capazes de se curar espontaneamente e adquirir um perfil de resistência contra reinfecções (Silveira, comunicação pessoal). De fato, o estudo conduzido por Silva 2003 durante sua dissertação de mestrado, demonstrou que os antígenos de *L. (V.) shawi* possuíam mais especificidade e sensibilidade para detectar anticorpos de pacientes infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, tais como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) naiffii*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis* e da própria *L. (V.) shawi*, em comparação ao antígeno da *L. (L.) amazonensis*, indicando que os antígenos de tal espécie poderiam ser imunogênicos a humanos, e, portanto, um interessante alvo para o desenvolvimento de candidatos vacinais.

Como não havia dados suficientes sobre *L. (V.) shawi* foi necessário investigar alguns aspectos relacionados à biologia do parasito anteriormente

às imunizações experimentais. Neste sentido, o primeiro passo efetuado foi analisar o crescimento das formas promastigotas pertencente às cepas M8408 e M15789. Os dados obtidos demonstraram que as formas promastigotas da cepa M15789 cresceram mais em comparação a M8408 em meio RPMI 1640, o que facilitava a produção de antígenos. Este fato também nos incentivou a trabalhar com *L. (V.) shawi*, pois algumas cepas de parasitos têm grandes dificuldades de crescimento em meio R10, tal como a *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*, e, portanto necessitam de meios mais ricos e complexos para crescer, como o NNN (ágar sangue) e Schneider (Giudice et al., 2007; Salhi et al., 2008), e que de certa forma pode atrapalhar na purificação de antígenos, devido a diferentes tipos de materiais insolúveis presentes no meio NNN, por exemplo. Além disso, as cepas de *L. (V.) shawi* apresentaram um típico perfil de crescimento, variando de uma fase lag para logarítmica, passando para estacionária e por fim de declínio. Embora um perfil clássico, houve diferenças de crescimento entre seus crescimentos, que possivelmente, se correlaciona com a diversidade genética encontrada entre parasitos da mesma espécie (Ishikawa et al., 2002). Este fato também pôde ser comprovado através das infecções *in vitro* em macrófagos peritoneais, extraídos de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, onde um maior índice de infecção foi visto nos macrófagos infectados com a cepa M15789. É relativamente comum existir capacidade diferencial de infecção entre diferentes cepas de uma mesma espécie, como visto por Campos et al., (2008), estudando a infectividade de cepas de *Leishmania* do Novo Mundo em macrófagos peritoneais de

camundongos BALB/c. Neste mesmo trabalho foi encontrada uma associação entre maior infectividade e menor produção de nitratos por macrófagos, contudo, nas infecções macrofágicas por *L. (V.) shawi* esta associação não ocorreu nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com ambas as cepas estudadas. É reconhecida uma série de outros fatores da célula hospedeira capazes de eliminar parasitos, como o peróxido de hidrogênio, superóxido entre outros metabólitos derivados do oxigênio e nitrogênio (Liew et al., 1990a; Gaspar et al., 1992). Portanto, é possível assumir que neste tipo de infecção, o óxido nítrico não seja a única molécula envolvida na eliminação de parasitos intracelulares. Outro importante fator associado aos resultados da infecção *in vitro* foi a questão da maior susceptibilidade à infecção das células extraídas dos camundongos BALB/c em relação àquelas dos C57BL/6.

Os estudos *in vivo* comparativos confirmaram a maior infectividade da cepa M15789 em comparação à M8408, tanto em BALB/c quanto em C57BL/6. Esta análise inicial da infectividade entre as cepas foi extremamente importante para escolher uma cepa padrão para as análises de imunização, pois uma cepa que induza uma patologia pouco mensurável não seria uma boa escolha, pois o tamanho da lesão é o pré-requisito para se analisar os diferentes aspectos associados à susceptibilidade e resistência na LTA (Ji et al., 2003). Por esta razão, a cepa M15789 de *L. (V.) shawi* foi escolhida para o desenvolvimento das outras metodologias e aquisição de resultados.

Comparativamente, foi visto que ambos os camundongos BALB/c e

C57BL/6 foram susceptíveis à infecção, contudo, foram verificadas diferenças entre os perfis de infecções, pois os camundongos BALB/c apresentaram maiores tamanhos de lesão e densidade parasitária que C57BL/6, demonstrando sua maior susceptibilidade à infecção. Estudos clássicos mostraram que nas infecções por *L. major* é visto um perfil diferenciado de infecção nestas linhagens de camundongos, pois os camundongos BALB/c apresentam doença progressiva, evoluindo para disseminação parasitária e morte, enquanto os C57BL/6 são resistentes à infecção, pois apresentam uma doença auto-limitada, com regressão dos parasitos em pele bem como os sinais clínicos (Nasseri & Modabber, 1979; Howard et al., 1980; Sadicks et al., 1986; Louis et al., 2002). Entretanto, com as cepas do Novo Mundo este perfil é totalmente diverso, como visto por Cupolillo e colaboradores (2003), cujos estudos demonstraram que uma cepa de *L. (L.) amazonensis* causadora de doença anérgica difusa humana foi capaz de infectar camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e C57BL/10 (os dois últimos resistentes à infecção por *L. major*), sendo o tamanho da lesão, carga parasitária e os achados histopatológicos similares nas três linhagens murinas. Este fato foi posteriormente corroborado utilizando-se outra cepa de *L. (L.) amazonensis* causadora da forma cutânea localizada, onde os camundongos C57BL/6 também desenvolviam lesões, mas em menor grau que os C57BL/6 (Abreu-Silva et al., 2004). Por outro lado, encontra-se a *L. (V.) braziliensis* que é capaz de gerar lesões pequenas e auto-limitadas tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 (Maioli et al., 2004; Rocha et al., 2007). Assim, é possível assumir que não somente a

genética do hospedeiro é responsável pelo perfil final da infecção, mas também as características inerentes ao protozoário, pois é visto que algumas espécies também são capazes de infectar os animais pré-definidos como resistentes.

Os animais experimentais infectados com *L. (V.) shawi* desenvolveram lesão progressiva durante o curso da infecção refletindo os achados histopatológicos, que foram mais pronunciados nos camundongos da linhagem BALB/c. Esta lesão foi caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório, com macrófagos densamente parasitados, moderada densidades de neutrófilos e linfócitos bem como baixas de plasmócitos. Nas fases mais tardias de infecção, os neutrófilos margeavam extensas áreas de necrose tecidual. Alguns estudos vêm demonstrando que em lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em humanos e animais experimentais também foram detectadas altas densidades de células parasitadas, linfócitos e polimorfonucleares, que em conjunto tiveram alta associação com patogênese da doença (McKinney & Hendrix 1980; Moraes et al., 1994; Tacchine-Cottier et al., 2000; Wanasen et al., 2008; Silveira et al., 2005). Além disso, a presença de necrose em lesões cutâneas e mucocutâneas humanas causadas por *L. (V.) braziliensis* têm sido associada ao parasitismo, destruição tecidual e também a um requerimento maior de fármacos para se obter regressão nas lesões (Gutierrez et al., 1991; Boaventura et al., 2010). Como em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) shawi* estes tipos celulares e processos histopatológicos foram mais freqüentes, é possível assumir que o parasito foi

mais patogênico a esta linhagem em comparação aos camundongos C57BL/6, indicando que embora ambos os camundongos sejam sensíveis à infecção, os camundongos BALB/c foram mais susceptíveis.

Outro interessante marcador da progressão de doença na leishmaniose são os anticorpos anti-*Leishmania* (Mimori et al., 1987; Leandro et al., 2001; Todolí et al., 2010). Através de seus níveis, mensurados através da absorbância, e principais isótipos circulantes, é possível verificar se os animais ou pacientes se direcionam ao pólo de susceptibilidade ou resistência (Miles et al., 2005; Chu et al., 2010). Os camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) shawi* produziram altos níveis de IgG anti-*Leishmania*, que em sua totalidade estiveram relatados ao isótipo IgG1, um importante marcador de doença em infecções naturais e experimentais (Oliveira et al., 2009). Por outro lado, os camundongos C57BL/6 apresentaram baixos níveis de IgG total e IgG1, sendo o maior pico encontrado na 6ª e 8ª semanas PI. Histopatologicamente, os camundongos BALB/c apresentaram uma grande estimulação dos centros germinativos nos linfonodos popliteos, enquanto os C57BL/6 pouca. Esta estimulação se correlaciona à proporção de anticorpos encontrada, uma vez que estas regiões de órgãos linfóides são ricas em linfócitos B, e quanto maior o estado de ativação, maior podem ser os níveis de anticorpos (Reinhardt et al., 2009; Kasturi et al., 2011). Além disso, os níveis de IgG2a que é um marcador de resistência ligado a altos níveis de IFN- γ na doença humana e canina (Ferreira et al., 2008) não foi detectado em nenhuma linhagem de camundongos infectados com *L. (V.) shawi*, indicando que em BALB/c há

uma progressão rápida da doença, enquanto que em C57BL/6 esta progressão é mais lenta.

Em associação com o tamanho de lesão, carga parasitária, achados histopatológicos, níveis de IgG total e IgG1 anti-*Leishmania*, foi possível inferir que os camundongos da linhagem BALB/c apresentaram susceptibilidade à infecção por *L. (V.) shawi*. Embora os camundongos C57BL/6 também possam ser considerados susceptíveis, comparativamente eles apresentaram um perfil intermediário de infecção durante o período analisado. Portanto, pode-se considerar que o camundongo BALB/c mimetiza aspectos da doença natural, sendo um interessante modelo experimental para o estudo de imunopatologia e de candidatos vacinais. Por esta razão, estes animais foram utilizados para os estudos de imunização experimental com antígenos derivados de *L. (V.) shawi*.

Em busca por candidatos vacinais mais eficientes contra a leishmaniose tegumentar americana, no presente estudo, foram testados 10 diferentes antígenos, os quais levaram a respostas completamente diversas, relacionadas à proteção e exacerbação da doença nos animais submetidos à imunização.

Os primeiros antígenos avaliados foram os secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi*. Eles foram considerados interessantes alvos, pois são uma das primeiras moléculas a interagir com o sistema imune inato e estabelecer uma intrínseca interação fisiológica com a célula hospedeira, portanto, devem ser capazes de direcionar a resposta para diferentes pólos imunológicos. Além disso, importantes estudos usando

os antígenos secretados/excretados de *L. infantum* mostraram seu potencial como candidatos vacinais, uma vez que em modelo experimental murino e canino houve proteção contra a infecção, associado à polarização da resposta para um perfil Th1 (Rosa et al., 2005; Lemesre et al., 2005).

De fato, foi visto que os animais imunizados com as frações de alta, média e baixa MMs apresentaram alteração da resposta imune celular, e em alguns casos houve alteração no curso clínico da infecção, o que evidencia a imunogenicidade e o caráter protetor destes antígenos derivados de *L. (V.) shawi*. As modificações imunológicas foram quantificadas a partir dos níveis de expressão de IFN- γ e IL-4, pois expressão de seus mRNA é equivalente à sua produção (Rosa et al., 2006). Além disso, estudar o perfil de expressão de citocinas de subpopulações pode ser útil no entendimento de suas funcionalidades durante o processo de infecção.

O grupo que foi imunizado com a fração de alta MM e posteriormente desafiado não apresentou proteção, uma vez que não houve regressão do tamanho da lesão e a carga parasitária foi similar a do grupo infectado. Embora se tenha detectada alta expressão de IFN- γ e baixa de IL-4 nos linfócitos T CD8⁺, este perfil não foi suficiente para estabelecer proteção nestes animais. Interessantemente, neste grupo experimental, as células dnCD4CD8 (população de células que contém macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, plasmócitos e células natural killer) não apresentaram modificação imunológica alguma quando comparado aos animais infectados, o que pode se correlacionar a uma menor produção de metabólitos capazes de eliminar parasitos, pois a produção de IFN- γ , em

uma maneira autócrina, também poderá levar a ativação de células efetoras (Aranha et al., 2005). Além disso, indivíduos infectados com *Leishmania* sp. que possuíam altas freqüências de células dnCD4CD8 produtoras de IFN- γ tiveram melhor prognóstico que os indivíduos com baixa expressão (Antonelli et al., 2006), ou seja, para haver proteção deverá haver polarização da resposta imune para um perfil Th1 em diferentes subpopulações celulares.

Por outro lado, os animais imunizados com a fração de média MM e posteriormente desafiados, foram capazes de inibir a progressão da lesão de pele bem como a carga parasitária. Esta proteção se associou à elevação da expressão de IFN- γ por todas as populações celulares estudadas, indicando que diferentes tipos celulares puderam ser fontes desta citocina após desafio, tal como linfócitos, macrófagos e células NK (Ota et al., 2008). Em contraste, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ destes animais expressaram altos níveis de IL-4, que por sua vez pode inibir a expressão e bioatividade de IFN- γ (Radwanska et al., 2007), indicando que a resposta induzida pela imunização é protetora, e associada a um perfil misto de resposta imune, gerando proteção parcial neste grupo.

Os animais que foram imunizados com a fração de baixa MM e posteriormente desafiados também foram capazes de inibir o crescimento da lesão e a multiplicação de parasitos. Neste grupo, houve aumento da expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4⁺ e nas células dnCD4CD8. Em contrapartida, também foi verificado aumento da expressão de IL-4 nos linfócitos T CD4⁺, indicando que a proteção induzida por esta fração esteve

também associada às respostas Th1 e Th2, principalmente ditadas pelos linfócitos T CD4⁺ e células dnCD4CD8. Interessantemente, esta imunização favoreceu a supressão da expressão de citocinas pelos linfócitos T CD8⁺ tanto nos grupos saudáveis (dados não mostrados) quanto nos desafiados. Na imunopatologia das leishmanioses não está muito bem esclarecido o papel funcional dos linfócitos T CD8⁺, pois algumas evidências sugerem que tais células são fundamentais na eliminação parasitária, e que terapias que as estimulem seriam importantes para geração de imunidade (Hernández-Ruiz et al., 2010). Mas também alguns relatos indicam que até mesmo na doença humana estas células podem ser responsáveis por exacerbar a patologia (Faria et al., 2009), possivelmente quando caracterizadas como pertencentes à subpopulação Tc2. Entretanto, na infecção experimental por *L. major* foi visto que os camundongos BALB/c depletados de linfócitos T CD8⁺ apresentaram uma alteração funcional nos linfócitos T CD4⁺, que passaram a expressar menos IFN- γ comparado aos animais não depletados, indicando que possivelmente os linfócitos T CD8⁺ são importantes, mesmo que indiretamente, na estimulação dos CD4⁺ e geração da imunidade (Herath et al., 2003). Contudo, tem sido demonstrado que antígenos secretados/excretados estimulam primariamente os linfócitos T CD4⁺ a expressarem IFN- γ , sendo este fato associado à alta taxa de proteção visto na leishmaniose visceral murina (Rosa et al., 2007). Ou seja, a proteção induzida por esta fração deve estar ligada principalmente à estimulação dos linfócitos T CD4⁺ e dnCD4CD8. Contudo, a ausência de resposta dos linfócitos T CD8⁺ tanto pode estar ligada à proteção ou ausência de uma

cura estéril. Adicionalmente, a supressão da expressão de citocinas nestes linfócitos também pode ser reflexo do grande número de transcritos codificadores de TGF- β produzidos por esta população linfocitária (dados não mostrados), mas como nem sempre a expressão desta citocina se reflete em sua produção (Taylor 2009), a diminuição da resposta destas células pode também ser um efeito direto da imunização.

Os resultados encontrados com as proteínas secretados/excretados indicam que as moléculas do parasito mais expostas à imunidade podem interagir a favor do hospedeiro, podendo gerar proteção, como já vem sendo indicado por alguns autores (Kaufmann & Hess 1999; Prickett et al., 2006).

Embora exista o consenso de melhor reconhecimento de antígenos mais expostos dos microorganismos pelo sistema imune do hospedeiro, uma série de evidências também vem demonstrando que antígenos intracelulares podem ser considerados importantes fontes na busca de novos alvos vacinais, tal como mostrado pelo grupo de Bhaumik et al. (2009), que obtiveram proteção completa através de imunizações em camundongos BALB/c com antígeno intracelular solúvel das formas promastigotas de *L. donovani*. Além disso, foi demonstrado que antígenos intracelulares purificados tanto de formas amastigotas quanto de promastigotas podem induzir imunidade associada à proteção em camundongos BALB/c (Beyrodt et al., 1997; Ghosh et al., 2001). Em adição, os antígenos intracelulares são alternativas atrativas, pois se encontram em relativa abundância e diversidade protéica quando comparados aos antígenos secretados/excretados ou de membrana, o que de fato pode facilitar o

encontro de candidatos vacinais. Por esta razão, os antígenos intracelulares das formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) shawi* também foram analisados em relação à proteção.

A imunização com AgAma e AgPro alteraram o curso da infecção causada por *L. (V.) shawi*. Os camundongos imunizados com AgAma e posteriormente desafiados tiveram uma exacerbação da lesão, sendo que a carga parasitária na pele e no linfonodo estiveram aumentados em relação aos animais infectados. Esta imunização suprimiu a produção de citocinas, que pode ser atribuída ao aparecimento de TGF- β nos animais imunizados, cuja bioatividade se correlaciona com a produção e expansão de células Th3, que são hábeis em estimular a diferenciação de células T naíve em populações de células regulatórias (Carrier et al., 2007). Em adição, esta citocina também é capaz de suprimir ambas as respostas Th1 e Th2 (Barral-Netto et al., 1992; Reed et al., 1992; Laouar et al., 2005). De fato, sua produção pelos animais imunizados com AgAma deve ter desativado a resposta da subpopulação de linfócitos reconhecidos como protetores, permitindo desta forma a multiplicação exagerada das formas amastigotas em pele e linfonodos poplíteos. Isto pode ser mais bem compreendido quando se analisa a resposta imune dos animais apenas infectados, que foi mais balanceada, com a presença de citocinas Th1, Th2 e regulatória, bem como relativo controle da carga parasitária. Fato este que não foi observado nos animais submetidos à imunização e que sofreram de lesões não controladas. Alguns estudos prévios vêm afirmando o potencial supressor dos antígenos de formas amastigotas de *Leishmania* sobre a resposta

imune, como os demonstrados pelo grupo de O'Daly, que observaram redução de até 100% nos sinais clínicos da psoríase em pacientes tratados com antígenos das formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* (O'Daly et al., 2009 a; O'Daly et al., 2009 b). Como a psoríase é uma doença mediada por linfócitos T e macrófagos (Gudjonsson et al., 2004; Wang et al., 2009), é possível que estes antígenos possam suprimir os efeitos pró-inflamatórios destas populações celulares, levando a supressão imunológica. No caso dos animais imunizados com os antígenos de amastigotas de *L. (V.) shawi*, a proliferação de parasitos foi superior àquela vista nos animais apenas infectados, indicando que estes antígenos são supressores, assim como visto pelo grupo de O'Daly. Entretanto, a imunização com AgAma não foi capaz de controlar a resposta imune humoral dos animais, pois foi visto que estes produziram exacerbados níveis de IgG total. Este fato pode se associar a constante estimulação de linfócitos B nos linfonodos ocasionada por uma alta carga parasitária encontrada. Portanto, em conjunto, os dados indicam que antígenos das formas amastigotas de *L. (V.) shawi* são naturalmente supressores dos mecanismos da resposta imune, e portanto, não são alvos para desenvolver um candidato vacinal contra LTA.

Por outro lado, os camundongos imunizados com AgPro e posteriormente desafiados, controlaram o desenvolvimento da lesão, bem como a replicação das formas amastigotas na pele, mesmo com elevados níveis de TGF- β . Além disso, foi possível detectar menores níveis de IL-4 e a IL-10 não foi detectada, possivelmente pela ação do TGF- β . Também, as

células estimuladas dos animais imunizados foram capazes de produzir IL-12 e IFN- γ , associado a baixos níveis da resposta imune humoral. Este fato indica que o antígeno induziu um melhor balanço da resposta imunológica, gerando uma lesão menor em relação aos animais infectados, durante todo o período experimental. Alguns estudos vêm demonstrando o importante papel desempenhado pela IL-12 na geração da resistência contra infecções intracelulares, pois em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* esta citocina pôde direcionar a resposta imune para um fenótipo basicamente relacionado ao fenótipo Th1 (Souza-Neto et al., 2004) e manter células efetora e de memória produtoras de IFN- γ (Mattner et al., 1996; Ota et al., 2008; Lezama-Dávila et al., 2008), permitindo, desta forma, a geração de imunidade protetora. Em adição, a supressão da produção de IL-4 e IL-10 é um pré-requisito para o sucesso na imunização experimental, como demonstrado anteriormente através de imunização com diferentes preparados antigênicos de *L. donovani* (Nagill et al., 2009).

Embora tenha sido observada proteção na pele do grupo imunizado com AgPro, esta proteção não se estendeu ao linfonodo poplíteo. Este efeito diferencial pode estar relacionado à alta produção de TGF- β , nos linfonodos e, portanto, à conversão de linfócitos a um fenótipo regulatório (Chen et al., 2003), gerando células irresponsivas a IL-12 e IFN- γ (Belkaid et al., 2002; Bogdan 2008). Sendo um favorecedor da infecção, o TGF- β também pode se associar a efeitos protetores ao hospedeiro, impedindo injúrias teciduais mediadas por excessiva produção de citocinas inflamatórias (Shull et al., 1992). Desta forma, a imunização com AgPro foi

capaz de restaurar os níveis de IL-12 e manter os níveis de IFN- γ . Além disso, a supressão da IL-4 e IL-10 foi um fator importante para adquirir proteção parcial. Entretanto, a presença de TGF- β deve ter sido um dos principais fatores responsáveis pela ausência completa de proteção.

Devido à proteção induzida pelo AgPro e diversidade de antígenos presentes foi efetuado um fracionamento bioquímico, objetivando purificar os principais antígenos. Este fracionamento se baseou em cromatografia líquida de fase reversa (rv-HPLC). A superfície da fase estacionária da coluna cromatográfica é um componente altamente hidrofóbico e a fase móvel inicial é polar, sendo assim, as moléculas hidrofóbicas se ligam preferencialmente à fase estacionária, permitindo que as moléculas mais hidrofílicas sejam eluídas em tampão. Conforme a faixa de polaridade é modificada, através da mudança do gradiente, grupos de moléculas se desligam da matriz sólida e são eluídas (Fallon et al., 1990). Neste sentido, foi possível purificar cinco diferentes frações protéicas, sendo que a constituição dos antígenos F1 e F2 eram altamente polares, F3 de polaridade intermediária, F4 e F5 apolares. O cromatograma obtido das frações demonstrava que F1 representava uma única molécula, e os outros antígenos foram considerados várias moléculas reunidas.

Após este processo de purificação, foi feita uma caracterização de proteínas por eletroforese, onde o bandejamento de todas as frações foi visualizado, exceto a F1. Posteriormente, foi visto, através de cromatografias, uma absorção maior desta fração a 220nm que a 280nm, indicando a presença de peptídeos. Foram realizados diferentes protocolos

de eletroforese para determinar massa molecular e número de moléculas pertencentes a esta fração, contudo resultados negativos foram obtidos. Por esta razão, tentou-se caracterizar a amostra através de espectrometria de massas.

Os dados espectrométricos revelaram que F1 é constituída por 67 diferentes peptídeos, os quais são fragmentos de proteínas maiores. Para produção do antígeno solúvel, as formas promastigotas de *L. (V.) shawi* estavam em fase estacionária de crescimento, sendo considerado o período em que ocorre a metaciclogênese. Concomitantemente, se inicia a exaustão de nutrientes do meio de cultura, havendo, portanto morte celular. Tanto na metaciclogênese quanto na morte celular, algumas proteínas são recicladas (*turnover* proteico), ou seja, através da ação regulada de diversas famílias de proteases ocorre a degradação de algumas proteínas (Besteiro et al., 2007). Também, algumas proteases, sobretudo as serino proteinases, podem ter sido responsáveis pela geração de fragmentos de proteínas após lise parasitária para produção de antígenos, uma vez que no presente trabalho foi utilizado apenas um inibidor de protease, o EDTA, que é capaz de inibir preferencialmente as metaloproteinases (de Sousa et al., 2010). Além disto, os solventes orgânicos em que o antígeno foi solubilizado e eluído podem favorecer a proteólise de alguns componentes (Fallon et al., 1990). Possivelmente, por uma destas razões, ou seu conjunto, foi possível purificar este grupo de peptídeos, nomeados como F1.

Através dos dados espectrométricos, foi verificado que a maioria destes peptídeos não possuía nenhuma atividade relatada, uma vez que são

proteínas hipotéticas, por outro lado, apenas uma minoria destes antígenos apresentou alguma atividade relacionada à homeostasia parasitária, desenvolvimento de patologia, resistência a drogas, imunidade e nutrição. Embora apenas 6% dos antígenos tenham sido relacionados à imunidade, é possível que outros componentes presentes em F1 possam modular a resposta imune nos animais imunizados, até porque em modelo de predição, diversas moléculas foram capazes de se ligar a MHCI e MHCII, ou seja, espera-se que induzam respostas imunes.

E em fato, os grupos de animais imunizados com F1 tiveram o maior potencial protetor, digno de nota é o fato de que este antígeno pode representar uma interessante medida profilática, uma vez que gerou imunidade duradoura. Além disso, as células destes animais quando estimuladas com o AgT produziram aumentados níveis de IFN- γ e reduzidos de IL-4, indicando que o contato com produtos específicos derivados das formas promastigotas induzirá uma resposta benéfica ao hospedeiro, tanto em períodos mais recentes quanto mais distantes da última imunização. Estudos anteriores demonstraram a importância da polarização da resposta imune para um perfil Th1, pois estudos de transferência passiva de linhagens linfocitárias produtoras de IFN- γ provindas de animais imunizados com diferentes formulações antigênicas gerava proteção a animais saudáveis, uma vez que estimulava os mecanismos efetores da resposta imune inata. Contrariamente, a transferência de linhagens secretoras de IL-4 promovia exacerbação da lesão (Scott et al., 1988; Heinzl et al., 1989), por estimular basicamente a população de linfócitos Th2 (Nelms et al., 1999).

Portanto, é de se esperar que este perfil de resposta imune gerasse resistência aos animais experimentais submetidos à imunização. Em contrapartida, as células estimuladas com AgT ou F1 dos grupos imunizados com F1 também produziram altos níveis de IL-10. Tem sido demonstrado que esta citocina é responsável por prevenir a ativação macrofágica e diminuir a produção de citocinas do perfil Th1 (Kane & Mosser 2001), levando primariamente à manutenção de baixo parasitismo no sítio crônico da infecção (Belkaid et al., 2001). Interessantemente, algumas linhas de pesquisas indicam que a manutenção dos parasitos, desde que em baixo número, leva a resistência contra re-infecções causadas por *Leishmania* sp, mas sua eliminação leva a perda de imunidade duradoura, refletindo uma importante estratégia para o equilíbrio entre o parasito e hospedeiro (Belkaid et al., 2002). Portanto, após contato com as formas promastigotas, o sistema imune dos grupos imunizados com F1 poderá promover um balanço entre a resposta Th1 e regulatória, que levará a eliminação de uma grande parte dos parasitos, contudo poderá haver persistência parasitária.

Ainda, as células extraídas dos grupos F1 e F1 – 4 meses quando estimuladas com F1 apresentaram um perfil similar de citocinas daquele produzido pelas células estimuladas com AgT, exceto pelo fato de que houve aumento na produção de IL-4. O aumento dos níveis desta citocina pode também se correlacionar à ausência de proteção completa neste grupo experimental, uma vez que os parasitos intactos também possuem tais antígenos presentes na fração F1 e são capazes de liberá-los espontaneamente ao meio extracelular (dados não mostrados), podendo,

desta forma, estimular a proliferação de uma menor população de linfócitos Th2. Embora classicamente aceita como indutora de patologia, a IL-4 pode também facilitar a geração, proliferação e manutenção de linfócitos T CD8⁺ de memória em infecções experimentais causadas por *L. donovani* e *Plasmodium yoelii* (Stäger et al., 2003; Carvalho et al., 2002).

De fato, o grupo imunizado com F1 apresentaram frequências similares ao controle de linfócitos T CD8⁺CD62L^{low}, que pode ser considerados como linfócitos T CD8⁺ de memória (Sallusto et al., 2004), indicando que a imunização manteve os níveis fisiológico desta subpopulação, mas nos animais não imunizados e infectados a frequência relativa desta população diminuiu, mostrando que o parasito pode alterar o número destas células, pois nestes animais não houve proteção.

Similarmente, os animais pertencentes ao grupo F1 – 4 meses apresentaram níveis aumentados de tal subpopulação comparado aos animais apenas infectados, e também em relação ao grupo saudável, possivelmente pelo fato de que houve um grande período entre a última imunização e o desafio, fato este que pode se correlacionar com a geração de uma maior quantidade de células de memória. Possivelmente, os níveis aumentados das células CD8⁺ de memória possam se associar a um melhor prognóstico da doença experimental, pois foi visto que ao redor de 60 dias PI camundongos com um fenótipo de resistência nas infecções por *L. infantum* possuíam maiores níveis de linfócitos de memória em comparação aos animais susceptíveis (Gomes-Pereira et al., 2004), demonstrando a habilidade desta subpopulação de linfócitos T CD8⁺ em auxiliar na

resistência contra infecções.

Como também se reconhece o papel patogênico dos linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose, foi efetuada a fenotipagem destes utilizando o marcador CD45RB, pois se sabe que linfócitos expressando baixos níveis deste marcador (CD45RB^{low}) são considerados como efetores, mas podem ser patogênicos, pois algumas destas subpopulações podem produzir IL-4 e IL-10 (Powrie et al 1994), por outro lado, os CD45^{high}, considerados protetores, podem produzir IFN- γ , quando devidamente estimulados. Neste caso, foi visto que os grupos F1, F1 – 4 meses e saudáveis apresentaram valores similares da subpopulação de linfócitos CD3⁺CD8⁺CD45RB^{low}, indicando que a imunização pode ter um efeito protetor, evitando o acúmulo destas células nos linfonodos. Por outro lado, foi visto que o grupo infectado apresentou diminuição significativa desta subpopulação em relação aos animais saudáveis. Este fato sugere que nos animais infectados há migração desta população celular para o sítio da infecção, pois foi visto que em animais susceptíveis e infectados por *L. (V.) shawi* há uma diminuição de linfócitos T CD8⁺ nos linfonodos e aumento na pele, concomitante ao ampliação da carga parasitária (Passero et al., 2010), indicando que em animais apenas infectados a diminuição destas células em órgãos linfóides se associa mais a sua migração do que ao efeito imunossupressor causado pelo parasito.

Ainda em relação ao trabalho citado acima, foi visto que além da diminuição dos linfócitos T CD8⁺ também havia diminuição significativa dos CD4⁺ em linfonodos popliteais, mas esta queda no número de células se correlacionava ao aumento de suas densidades no sítio da infecção. Este

achado também foi detectado nos grupos imunizados com F1, e a hipótese de imunossupressão causada pelo parasito ou imunização não deve ser verdadeira, uma vez que estas células puderam produzir citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, portanto, a diminuição destas células nos linfonodos também deve se correlacionar à sua migração para o sítio da infecção.

Outra importante alteração verificada no grupo F1-4 meses foi a diminuição da concentração de IL-2 em relação aos animais infectados. Esta citocina apresenta grande importância na ativação de células NK e na proliferação celular. Possivelmente houve diminuição na produção desta citocina devido aos altos níveis de IL-10 produzidos neste grupo. Embora tenha havido esta diminuição da IL-2, as células do grupo F1 – 4 meses mantiveram sua capacidade proliferativa, independente da presença de estímulos. A capacidade proliferativa das células destes animais também pode se refletir no potencial que alguns peptídeos, presentes no antígeno F1, possuem em se ligar às moléculas de MHCI ou MHCII, como verificado no modelo de predição de ligação (<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc>), facilitando a apresentação de antígenos aos linfócitos.

Nos grupos submetidos à imunização com F1 também foi possível detectar níveis diminuídos de IgG1 e aumentados de IgG2a, evidenciando que houve diminuição da resposta Th2 e estimulação da resposta imune celular, levando a resistência, mesmo que parcial (Ramírez et al 2010). Portanto, a proteção exercida por F1 foi duradoura com a participação de

linfócitos T CD8⁺CD62L^{low}, e T CD8⁺CD45RB^{low}, além disso, houve aumento da resposta imune celular, e diminuição da resposta Th2. Contudo, o aumento dos níveis de IL-10 neste grupo pode se associar a regulação imunológica e persistência parasitária. Ainda é digno de nota, o fato de que alguns antígenos, como a cadeia curta da desidrogenase, proteína S20 ribossomal, dineína e cisteína peptidase entre outras, presentes em F1, possam ser secretados/excretados ao meio extracelular por estar em íntima associação com vesículas de tráfico antigênico (Silverman et al., 2008). Possivelmente, a secreção destes componentes pelos parasitos nos animais imunizados com F1 possa se correlacionar com proteção, uma vez que é reconhecido o papel protetor de alguns destes antígenos (Stober et al., 2006; Doroud et al., 2011).

A fração F5 protegeu intermediariamente os animais experimentais, uma vez que houve diminuição da carga parasitária apenas na pele, não se estendendo a proteção aos linfonodos. Nas células estimuladas com AgT houve aumento na produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10, sendo a proteção associada a ambas respostas Th1 e Th2. Alguns estudos demonstraram que altos níveis de IFN- γ são requeridos para eliminação de parasitos, contudo na presença de altas concentrações de IL-4 e IL-10 as funções biológicas do IFN- γ podem ser atenuadas (Bhaumik et al., 2009). De fato, o papel biológico do IFN- γ não ocorreu nos linfonodos dos animais imunizados, este fato pode se refletir nas diferentes respostas imunológicas que podem ser encontradas na pele e em linfonodos (Brewig et al., 2009). Quando as células destes animais foram estimuladas com F5 houve um perfil similar na produção de

citocinas, exceto pelo fato de que houve um aumento na produção de IL-2, que se associa a ativação de células NK e proliferação celular (Resnick et al., 1988). Possivelmente, a ação da IL-2 pôde contrabalancear o efeito patogênico da IL-4 e IL-10, favorecendo a redução de parasitos na pele. Em adição, os animais tiveram uma elevação da resposta imune humoral, principalmente relacionado ao isótipo IgG1, sugerindo progressão da lesão, mesmo em face da eliminação de parasitos na pele. Provavelmente, a constante estimulação induzida por muitos parasitos viáveis nos linfonodos devem favorecer a produção aumentada deste isótipo. Portanto, a imunização com F5 gerou uma proteção parcial na pele, mas não nos linfonodos, sugerindo que houve imunidade órgão específica.

Em contraste, as imunizações com os antígenos F3 e F4 favoreceram o desenvolvimento das lesões e o aumento do número de parasitos na pele. As células estimuladas com AgT destes grupos produziram altos níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10, mas baixos de IL-2. Como indicado acima, as respostas Th2 e regulatória são capazes de inibir e regular a bioatividade de IFN- γ . Por conseguinte, a IL-2 tem um papel protetor na leishmaniose murina (Laabs et al., 2009) e como células NK ativadas por IL-2 são hábeis em ativar células produtoras de IFN- γ (Joyee et al., 2010), é possível então inferir que a ausência de proteção nos grupos imunizados com F3 e F4 esteve associada a uma inibição da resposta de IL-2 com conseqüente aumento de IFN- γ , IL-4 e IL-10. Ou seja, nem sempre a proteção deve ser vista como sinônimo da presença ou concentração de IFN- γ , pois os outros componentes da resposta imunológica também podem determinar o curso clínico da doença.

Este fato também foi demonstrado anteriormente por Anderson et al. (2005), que estudaram o perfil de infecção de uma cepa de *L. major* isolada de caso humano que não apresentou cura espontânea, e nos camundongos C57BL/6 infectados com tal cepa foi demonstrado que mesmo com a presença de elevados níveis de IFN- γ houve progressão da lesão, sendo associada a produção de IL-10. Darrah et al. (2010) também demonstraram que a presença de IL-2, IFN- γ e TNF- α não foram suficientes para gerar proteção nas infecções por *L. major* quando a resposta de IL-10 foi exacerbada. No caso dos experimentos realizados com *L. (V.) shawi*, esta exacerbação da lesão nos grupos pode estar associada à supressão da produção de IL-2, demonstrando que a ativação de outros componentes da resposta imune inata, tal como as células NK, também podem ser importantes para gerar proteção.

Em contraste, a imunização com o antígeno F2 não alterou o curso da infecção, contudo ocorreram modificações imunológicas neste grupo. As células estimuladas com AgT produziram baixos níveis de IL-2 e IL-4, mas altos níveis de IL-10. Já as células estimuladas com F2 produziram altos níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10. Embora este grupo possua um perfil associado à exacerbação de doença, houve redução de IL-4, que deve permitir um grau de infecção similar aos animais infectados, pois a IL-4 controla uma série de mecanismos imunológicos associados com susceptibilidade, além disso, este grupo apresentou níveis de anticorpos similares aos animais infectados, indicando que a alteração do perfil imunológico não foi suficiente para modificar o curso clínico da infecção.

Embora os resultados obtidos no presente estudo com os antígenos secretados/excretados e purificados por rv-HPLC sejam encorajadores na busca de um candidato vacinal, ainda se deve ter cautela em sua produção e administração a outros modelos experimentais, pois os antígenos que foram protetores ainda misturas de antígenos. E como tal, pode induzir diferentes respostas após imunizações nos animais, o que pode facilitar a permanência de parasitos no sítio da infecção, através da ação da resposta regulatória.

Como demonstrado neste estudo, há uma grande diversidade de fontes possíveis para se desenvolver candidatos vacinais a partir de uma única espécie, entretanto, é necessário haver um melhor entendimento da complexa interação entre células do sistema imune, suas moléculas efetoras, mediadores e parasitos para que seja possível encontrar candidatos vacinais mais efetivos como medida profilática contra a leishmaniose tegumentar americana. Além disso, um melhor entendimento dos fatores que regulam a persistência parasitária e seu papel na manutenção da memória imunológica pode ser extremamente importante para o desenvolvimento de melhores estratégias de vacinação.

Conclusão

6 - CONCLUSÃO

1. A avaliação da infectividade *in vitro* e *in vivo* das cepas de *L. (V.) shawi* mostrou que a cepa M15789 foi mais infectiva que a M8408.
2. Estudos *in vivo* demonstraram que os camundongos BALB/c foram mais susceptíveis à infecção por *L. (V.) shawi* em comparação ao C57BL/6, uma vez que apresentaram uma lesão cutânea maior, com alterações histopatológicas mais evidentes e maior parasitismo em pele e linfonodo poplíteo de drenagem.
3. Antígenos secretados/excretados pelas formas promastigotas de *L. (V.) shawi* de baixa massa molecular apresentaram uma maior taxa de proteção em camundongos BALB/c imunizados em comparação aos de alta e média massas moleculares, sendo a proteção associada à alta expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4⁺.
4. A imunização com antígenos solúveis de formas amastigotas de *L. (V.) shawi* suprimiram a resposta imune celular e induziram lesões descontroladas em camundongos BALB/c submetidos a esta imunização. Por outro lado, a imunização com antígenos solúveis de formas promastigotas de *L. (V.) shawi* mostraram protegeram os animais após desafio.

5. A imunização com a fração antigênica F1, purificada de formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, levou à proteção duradoura nos camundongos BALB/c com a presença de linfócitos T CD8⁺ de memória. A persistência de parasitos no sítio da lesão pode ser o reflexo do nível elevado de IL-10.
6. A imunização com a fração antigênica F5, purificada de formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, mostrou proteção apenas na pele dos animais, uma vez que não houve regressão da carga parasitária em linfonodo poplíteo de drenagem. Em contraste, as imunizações com F3 e F4 levaram a exacerbação das lesões e a imunização com F2 não alterou o curso da infecção em camundongos desafiados com formas promastigotas de *L. (V.) shawi*.
7. O antígeno F1 mostrou ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de candidatos vacinais definidos contra a Leishmaniose Tegumentar Americana.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Silva, AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, da Costa SCG. Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol.* 2004; 121:179–87.

Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 1993; 61: 2952-59.

Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine.* 2004; 22: 1631-39.

Anderson C, Mendez S, Sacks D. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2005; 174: 2934-41.

Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007; 204: 285-97.

Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimarães LH, Bacellar O, Gollob KJ. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4-

CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2006; 74: 6317-23.

Antunes CM, Mayrink W, Magalhaes PA, Costa CA, Melo MN, Dias M, Michalick MS, Williams P, Lima AO, Vieira JB. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol.* 1986; 15: 572-80.

Aranha F, Ribeiro UJ, Basse P, Corbett C, Laurenti M. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand J Immunol.* 2005; 62: 334-41.

Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science.* 2000; 290: 1354-58.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:767-11.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 1992; 257: 545–48.

Belkaid Y, Hoffmann K, Mendez S, Kamhawi S, Udey M, Wynn T, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin

after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med.* 2001; 194: 1497-06.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420: 502-07.

Berberich C, Ramírez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, Moll H. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol.* 2003; 170: 3171-79.

Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 1063-75.

Beyrodt CG, Pinto AR, Freymüller E, Barbiéri CL. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect Immun.* 1997; 65: 2052-59.

Bhaumik S, Naskar K, De T. Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 2146-60.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage

that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 2830-36.

Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as example. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 1221–34.

Bogdan C, Moll H, Solbach W, Röllinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol.* 1990; 20: 1131-35.

Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia.* 2000; 42: 183-90.

Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, Mostböck S, Ritter U. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol.* 2009; 182: 774-83.

Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Félix SM, Abath FG, da Graça GC, Porrozzi R, Ishikawa EA, Shaw JJ, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 2009; 14: 1278-86.

Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2008; 103: 771-76.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of FoxP3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007; 178:179–85.

Carneiro LA, Silveira FT, Campos MB, Brígido Mdo C, Gomes CM, Corbett CE, Laurenti MD. Susceptibility of *Cebus apella* monkey (Primates: Cebidae) to experimental *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*-infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011; 53: 45-50.

Carvalho, L. H., Sano, G., Hafalla, J. C., Morrot, A., Curotto de Lafaille, M. A., Zavala, F. IL-4-secreting CD4 T cells are crucial to the development of CD8 T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med.* 2002; 8: 166–70.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naïve T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198: 1875–86.

Chu N, Thomas BN, Patel SR, Buxbaum LU. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J Immunol.* 2010; 185: 6939-46.

Cupolilo SMN, Souza CSF, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* isolated from

a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strain of mice. *Histol Histopathol.* 2003; 18: 1059-65.

Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RW, Chen L, Roederer M, Seder RA. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J Exp Med.* 2010; 207: 1421-33.

de Sousa KP, Atouguia J, Silva MS. Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *Protein J.* 2010; 29: 283-89.

de Souza RA. Detecção de anticorpos IgG em casos humanos de leishmaniose tegumentar americana causada por diferentes espécies de *Leishmania* da Amazônia. [Dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2003.

Dominguez M, Toraño A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med.* 1999; 189: 25-35.

Donnelly KB, Lima HC, Titus RG. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J Parasitol.* 1998; 84: 97-03.

Doroud D, Zahedifard F, Vatanara A, Najafabadi AR, Rafati S. Cysteine proteinase type I, encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles induces

substantial protection against *L. major* infection in C57BL/6 mice. *Parasite Immunol.* 2011. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01289.x.

El-Adhami B. Isolation of *Leishmania* from a black rat in the Baghdad area, Iraq. *Am J Trop Med Hyg.* 1976; 25: 759-61.

Erb K, Blank C, Ritter U, Bluethmann H, Moll H. *Leishmania major* infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8⁺ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology.* 1996; 195: 243-60.

Fallon A, Booth RFG, Bell LD. Applications of HPLC in Biochemistry (Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biology). V17, Elsevier 1990.

Farah FS, Samra SA, Nuwayri-Salti N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 1975; 29: 755-64.

Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31: 432-39.

Ferreira JH, Gentil LG, Dias SS, Fedeli CE, Katz S, Barbiéri CL. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective

immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008; 26: 677-85.

Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol*. 1999; 91: 314-20.

Gaspar R, Prat V, Oppendoes FR, Roland M. Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: activity against intracellular *Leishmania donovani* associated with hydrogen peroxide production. *Pharm Res*. 1992; 9: 782-87.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis*. 2007; 7:7.

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

Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2004; 95: 63-70.

González CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine MM. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine*. 1998; 16: 1043-52.

Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannam-binding protein. *Mol Bioc Parasitol*. 1994; 66: 319-28.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*. 1990; 144: 278-83.

Greenblatt CL, Spira DT, Montilio B, Gerichter H. An improved protocol for the preparation of a frozen promastigote vaccine for cutaneous leishmaniasis. *J Biol Stand*. 1980; 8: 227-32.

Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*. 2004; 135: 1–8.

Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45: 281-89.

Mitchell GF, Handman E. T-lymphocytes recognise *Leishmania*

glycoconjugates. *Parasitol Today*. 1985; 1: 61-63.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*. 1989; 169: 59-72.

Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1993; 177: 1505-09.

Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e871.

Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol*. 2003; 25: 559-67.

Herrer A, Christensen HA. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1976; 25: 54-58.

Howard JG, Hale C, Chan-Liew WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of

susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol.* 1980; 2: 303-14.

Howard JG, Nicklin S, Hale C, Liew FY. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J Immunol.* 1982; 129: 2206-12.

Huber M, Timms E, Mak TW, Rölinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun.* 1998; 66: 3968-70.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhães AL, Guerra júnior RB, Melo MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: S111-21.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 2003; 71: 4278-88.

Jordan KA, Hunter CA. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol.* 2010; 126: 318-25.

Joyee AG, Uzonna J, Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha+ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection. *J Immunol.* 184: 2095-06.

Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin

S, Modabber F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*. 2005; 23: 3642-48.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*. 2001; 166: 1141-47.

Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI, Ravindran R, Stewart S, Alam M, Kwissa M, Villinger F, Murthy N, Steel J, Jacob J, Hogan RJ, García-Sastre A, Compans R, Pulendran B. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*. 2011; 470: 543-47.

Kaufmann SH, Hess J. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett*. 1999; 65: 81-94.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989; 170: 827-45.

Laabs EM, Wu W, Mendez S. Vaccination with live *Leishmania major* and CpG DNA promotes interleukin-2 production by dermal dendritic cells and NK cell activation. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 1601-06.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-85.

Lainson R, Braga RR, De Souza AA, Pôvoa MM, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n, a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1989; 64: 200-07.

Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol.* 2005; 6: 600–07.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 79: 273-84.

Lemesre JL, Holzmüller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine.* 2007; 25: 4223-34.

Lemesre JL, Holzmüller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine.* 2005; 23: 2825-40.

Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Barbi J, Cummings HE, Lu B, Satoskar AR. Role of phosphatidylinositol-3-kinase-gamma (PI3Kgamma)-mediated pathway in 17beta-estradiol-induced killing of *L. mexicana* in macrophages from C57BL/6 mice. *Immunol Cell Biol.* 2008; 86: 539–43.

Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1998; 64: 145-51.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990a; 145: 4306-10.

Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 1990b; 69: 570-73.

Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1987; 138: 744-49.

Louis J, Gummy A, Voigt H, Röcken M, Launois P. Experimental cutaneous Leishmaniasis: a powerful model to study in vivo the mechanisms underlying genetic differences in Th subset differentiation. *Eur J Dermatol.* 2002; 12: 316-28.

Maioli TU, Takane E, Arantes RME, Fieto JRL, Afonso LCC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res.* 2004; 94: 207–12.

Marsden PD. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XIV. Leishmaniasis. *Rev Infect Dis.* 1984; 6: 736-44.

Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, et al. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol*. 1996; 26:1553–59.

Mayrink W, Magalhães PA, Dias M, Da Costa CA, Melo MN, Lima AO. Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978; 72: 676.

Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979; 73: 385-97.

Mayrink W, Santos GC, Toledo Vde P, Guimaraes TM, Machado-Coelho GL, Genaro O, da Costa CA. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35: 125-32.

Mayrink W, Botelho AC, Magalhães PA, Batista SM, Lima Ade O, Genaro O, Costa CA, Melo MN, Michalick MS, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E, Machado-Coelho GL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39: 14-21.

McKinney LA, Hendricks LD. Experimental infection of *Mystromys albicaudatus* with *Leishmania braziliensis*: pathology. *Am J Trop Med Hyg*. 1980; 29: 753-60.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005; 201: 747-54.

Mimori T, Hashiguchi Y, Kawabata M, Gómez EA, De Coronel VV. The relationship between severity of ulcerated lesions and immune responses in the early stage of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Ann Trop Med Parasitol*. 1987; 81: 681-85.

Mohiuddin A. An investigation into the relationships between the species (parasitic in man) of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Part I. A study of the cultural characters and morphology with a statistical analysis of the relative measurements of the various species. *Indian J Med Res*. 1952; 40: 7-23.

Moll H, Berberich C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology*. 2001; 204: 659-66.

Moll H. Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cells internalize *Leishmania major* and induce an antigen-specific T-cell response. *Adv Exp Med Biol*. 1993; 329: 587-92.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-65.

Moraes MA, Silveira FT. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994; 36: 459–63.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002; 18: 399-05.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989; 7: 145-73.

Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol*. 1984; 132: 1501-05.

Murray HW. Effect of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1990; 161: 992-94.

Muskus CE, Marín Villa M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica*. 2002; 22: 167-77.

Muyombwe A, Olivier M, Ouellette M, Papadopolou B. Selective killing of *Leishmania* amastigotes expressing a thymidine kinase suicide gene. *Exp Parasitol*. 1997; 85: 35-42.

Muyombwe A, Olivier M, Harvie P, Bergeron MG, Ouellette M, Papadopolou B. Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice

vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis.* 1998; 177: 188-95.

Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 301-08.

Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1983; 76: 377-83.

Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun.* 1989; 57: 1343-46

Nagill R, Mahajan R, Sharma M, Kaur S. Induction of cellular and humoral responses by autoclaved and heat-killed antigen of *Leishmania donovani* in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Int.* 2009; 58: 359–66.

Nasser M, Modabber FZ. Generalized infection and lack of delayed hypersensitivity in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica major*. *Infect Immun.* 1979; 26: 611-14.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 701-38.

Noben-Trauth N, Kropf P, Müller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*. 1996; 271: 987-90.

Noben-Trauth N, Paul WE, Sacks DL. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J Immunol*. 1999; 162: 6132-40.

Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*. 2009; 183: 8088-98.

O'Daly JA, Lezama R, Rodriguez PJ, Silva E, Indriago NR, Peña G, et al. Antigens from *Leishmania* amastigotes induced clinical remission of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2009a; 301: 1–13.

O'Daly JA, Lezama R, Gleason J. Isolation of *Leishmania* amastigote protein fractions which induced lymphocyte stimulation and remission of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2009b; 301: 411–27.

O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 425-28.

Oliveira TM, Mineo TW, Bason M, Day MJ, Machado RZ. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. *Vet Parasitol*. 2009; 162: 16-22.

Oliveira TM, Vasconcelos EJ, Nakaghi AC, Defina TP, Jusi MM, Baldani CD, Cruz AK, Machado RZ. A novel A2 allele found in *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011; 20: 42-48.

Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 243-48.

Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol*. 2003; 25: 139-48.

Ota H, Takashima Y, Matsumoto Y, Hayashi Y, Matsumoto Y. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. *J Med Vet Sci*. 2008; 70: 589–93.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol*. 2003; 171: 3705-10.

Pakpour N, Zaph C, Scott P. The central memory CD4⁺ T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. *J Immunol*. 2008; 180: 8299-05.

Passero LFD, Sacomori JV, Corbett CE, Laurenti MD. Response of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the evolution of *Leishmania (Viannia) shawi* infection. *Comp Clin Pathol*. 2010; DOI: 10.1007/s00580-010-1123-1.

Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. 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*. 1996; 91:19-20.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1981; 127: 1438-43.

Pessoa SB, Pestana BR. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germes mortos. *Rev Biol Hyg*. 1940; 10: 112-18.

Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med*. 1994; 179: 589-00.

Prickett S, Gray PM, Colpitts SL, Scott P, Kaye PM, Smith DF. In vivo recognition of ovalbumin expressed by transgenic *Leishmania* is determined by its subcellular localization. *J Immunol*. 2006; 176: 4826-33.

Radwanska M, Cutler AJ, Hoving JC, Magez S, Holscher C, Bohms A, Arendse B, Kirsch R, Hunig T, Alexander J, Kaye P, Brombacher F. Deletion of IL-4Ralpha on CD4 T cells renders BALB/c mice resistant to *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2007; 3: e68.

Rafati S, Baba AA, Bakhshayesh M, Vafa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120: 134-38

Ramírez L, Iborra S, Cortés J, Bonay P, Alonso C, Barral-Netto M, Soto M. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 181690

Reed SG, da Silva JS, Ho JL, Koehler JK, Russo DM, Pihl DL, et al. Cytokine activation of human macrophages infected with HIV-1 to inhibit intracellular protozoa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1992; 5: 666-75.

Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol.* 2009; 10: 385-93.

Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol.* 1987; 138: 1926-32.

Resnick M, Roguel N, Bercovier H, Enk C, Frankenburg S, Kedar E. Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells *in vitro*. *Cell Immunol*. 1988; 113: 214-19.

Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu CY, Kirman JR, Turon TN, Davey DF, Davis H, Klinman DM, Coler RN, Sacks DL, Seder RA. Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and protection against leishmania major infection. *J Exp Med*. 2002; 195: 1565-73.

Rocha FJS, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathway, and effector molecules required for the control of *L. (V.) braziliensis* in mice. *Infect Immun*; 2007; 8: 3823-32.

Rodrigues MM, Mendonça-Previato L, Charlab R, Barcinski MA. The cellular immune response to a purified antigen from *Leishmania mexicana* subsp. *amazonensis* enhances the size of the leishmanial lesion on susceptible mice. *Infect Immun*. 1987; 55: 3142-48.

Rodrigues OR, Moura RA, Gomes-Pereira S, Santos-Gomes GM. H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Cell Immunol*. 2006; 243: 118-26.

Rosa R, Rodrigues OR, Marques C, Santos-Gomes GM. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. *Exp Parasitol*. 2005; 109: 106-14.

Rosa R, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Acta Trop*. 2006; 97: 309-17.

Rosa R, Marques C, Rodrigues OR, Santos-Gomes GM. Immunization with *Leishmania infantum* released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. *Vaccine*. 2007; 25: 4525-32.

Ruhland A, Kima PE. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol*. 2009; 122: 28-36.

Russell DG, Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol*. 1988; 140: 1274-79.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*. 2002; 3: 1041-47.

Sadick MD, Locksley RM, Tubbs C, Raff HV. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to *Leishmania* antigens in vitro. *J Immunol*. 1986; 136: 655-61.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A.

Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 2008; 180: 6139-48.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 745-63.

Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U. Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol.* 1992; 148: 3433-40.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988; 168: 1675-84.

Scott P, Caspar P, Sher A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. *J Immunol.* 1990; 144: 1075-79.

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R, Braga RR, Silveira FT. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, in Pará State, Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1991; 66: 243-46.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-B1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992; 359: 693–99.

Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104: 529-35.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. 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*. 1982; 76: 830-32.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 525-34.

Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*. 2008; 9: R35.

Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57: 115-18.

Singal P, Singh PP. *Leishmania donovani* amastigote component-induced colony-stimulating factor production by macrophages: modulation by morphine. *Microbes Infect.* 2005; 7: 148-56.

Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LCC. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 289–94.

Stäger S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, Smith DF, Brombacher F, Kaye PM. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8 T-cell responses. *Nat Med.* 2003; 9: 1287-92.

Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 2005; 207:19-30.

Stober CB, Lange UG, Roberts MT, Gilmartin B, Francis R, Almeida R, Peacock CS, McCann S, Blackwell JM. From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. *Vaccine.* 2006; 24:2602-16.

Sucen. <http://www.sucen.sp.gov.br/>

Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin

12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med.* 1993; 177: 1797-02.

Talamás-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol.* 1990; 144: 4817-24

Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol.* 2009; 85: 29-33.

Timm SL, Leon LL, Pereira NM, de Souza W, Queiroz-Cruz M, Bräscher HM, Lima AO. Isolation of an enriched plasma membrane-subpellicular microtubule fraction of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1980; 75: 145-55.

Todolí F, Solano-Gallego L, de Juan R, Morell P, Núñez Mdel C, Lasa R, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, Alberola J, Rodríguez-Cortés A. Humoral and in vivo cellular immunity against the raw insect-derived recombinant *Leishmania infantum* antigens KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 in dogs from an endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(6):1287-94.

Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2004; 199: 1559-66.

Valdés-Reyes L, Argueta J, Morán J, Salaiza N, Hernández J, Berzunza M, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L. *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol*. 2009; 121:199-07.

Van Voorhis WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs*. 1990; 40: 176-02

Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 417-29.

Wang H, Peters T, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. Key role of macrophages in the pathogenesis of CD18 hypomorphic murine model of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009; 129: 1100–14.

Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol*. 2011; 79: 647-62.

Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*. 2005; 201: 1053-59.

Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, Kelleher K, Herrmann SH, Clark SC, Azzoni L, Chan SH, Trinchieri G, Perussia B. Cloning of cDNA for natural killer cell

stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* 1991; 146: 3074-81.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990; 247: 1465-68.

WHO2001.

http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html

Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology.* 1995; 84: 173-76

Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, August JT, Brusic V. PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Res.* 2005 1;33.