

SAMARA FREIRE VALENTE

PERFIL DE RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR EXTRATO PARTICULADO DE *Leishmania braziliensis* OU DE *Leishmania chagasi* EM CAMUNDONGO C57BL/6

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V154p
2013

Valente, Samara Freire, 1988-
Perfil de resposta imune induzida por extrato particulado de
Leishmania braziliensis ou de *Leishmania chagasi* em
camundongo C57BL/6 / Samara Freire Valente. – Viçosa, MG,
2013.
x, 32f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-32

1. *Leishmania*. 2. Imunologia. 3. Anticorpos.
4. *Leishmania braziliensis*. 5. *Leishmania chagasi*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 579.4

SAMARA FREIRE VALENTE

PERFIL DE RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR EXTRATO PARTICULADO DE
Leishmania braziliensis OU DE *Leishmania chagasi* em CAMUNDONGO C57BL/6

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de Fevereiro de 2013.

Sílvia Almeida Cardoso

Monique Renon Eller

Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

“Tudo coopera para o bem daqueles que amam a DEUS.”

Romanos 8:28

Dedico este trabalho:

*A DEUS, que esteve comigo em cada etapa,
sustentando-me em tudo, enchendo-me de força
em meio a tantas dificuldades, a tanta saudade!
Meu grande estímulo para continuar sonhando,
vivendo e realizando. “Pois dele, por ele e para
ele são todas as coisas.” Rm 11:36*

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata pelas oportunidades que tive. O meu aprendizado foi além de científico e profissional, foi também muito pessoal. A elaboração deste trabalho foi uma tarefa que me proporcionou grande crescimento, principalmente porque pude conhecer pessoas que tenho o orgulho de ter convivido por todo o período do mestrado. Agradeço:

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao meu orientador, Eduardo, por ser tão solícito e por dedicar seu tempo em discussões de artigos e conversas que muito me acrescentaram, pelo estímulo, compreensão e apoio nos momentos mais importantes desse trabalho, pela paciência e confiança! Eduardo, você marcou uma etapa muito importante da minha vida.

À Monise e à Lorena, pelos bons momentos de descontração e, acima de tudo, pela amizade, por terem me ensinado muito sobre um pouco de tudo, pelas inesquecíveis viagens a congressos.

Ao Vinícius Paixão pela amizade cheia de conversas científicas.

À Michelle e ao Roberto, por sempre estarem a postos para ajudar, notavelmente pela ajuda nos experimentos de PCR em tempo real.

Ao André, com quem convivi nos primeiros meses no laboratório e me ensinou o lugar de todas as coisas. Um grande amigo!

À Thaís Vianna, pela parceria de grande importância e constante troca de ideias! À Priscila, à Bianca e ao Afonso, pela presença e empenho em colaborar.

À Sílvia Cardoso, pela imprescindível ajuda nos experimentos, disponibilidade em ensinar, e por transmitir uma grande calma em meio à correria e dias de trabalho intenso.

Ao professor Leandro Licursi pelos conhecimentos transmitidos tanto em sala de aula como em bancada e também pelas críticas construtivas e sugestões.

Ao professor Sérgio de Paula, por ter me recebido, pelo empenho em disponibilizar uma estrutura cada vez melhor para a realização dos trabalhos.

A todos do Laboratório de Imunovirologia e Glicobiologia pela excelente convivência diária, especialmente à Carinne, Vinícius Duarte, Mariana, Flávia, Lívia, Carol, Juliana e Monique. Ao apoio técnico, disposição e bom-humor do João.

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal, pela troca de informações, ajuda no cultivo celular e empréstimo de material, especialmente ao colegas Matheus, Mellina e Cláudia.

Ao professor Luciano Fietto e ao Murilo Alves pela colaboração na realização dos experimentos de qPCR.

À minha grande amiga Ana Carolina pela força, afeto, pelos momentos de compartilhar.

Aos grandes amigos que encontrei em Viçosa! Vocês tornaram os finais de semana e feriados mais agradáveis! À grande família que me acolheu - Igreja Presbiteriana de Viçosa, sou imensamente grata pela vida de todos vocês. Ao meu GC querido, amigos que vou levar para vida inteira.

Ao meu querido Marcelo por se fazer tão presente na minha vida, mesmo a 2.000 Km de distância, pelas visitas, apoio e companheirismo.

À minha mãezona, Semíramis, por ser tão amiga, conselheira, por ser minha grande inspiração e pelo seu apoio que me deu alicerce.

À minha irmã Natália, pelas conversas com amor, paz e sabedoria que me tornaram melhor.

Ao meu Pai, pela confiança e apoio! Às minhas duas pequenas irmãs, Geovana e Isabella, que compreenderam carinhosamente a minha ausência por todo este período.

Ao meu quarteto fantástico: Juliana, Jaciara e Gaby. Pelos encontros a cada ida a Teresina, amizade, animação e constante atualização uma da vida da outra.

A todas as garotas com quem dividi apartamento, especialmente: Márcia, Denise, Mellina, Débora, Letícia e Sabrina

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela experiência adquirida e pelo apoio financeiro. Ao meu orientador de bolsa-atividade, Gustavo Martins, pelo exemplo de simplicidade e comprometimento.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho, o meu “Muito obrigada”!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 – INTRODUÇÃO	1
2 - Revisão de Literatura	3
2.1 - <i>Características morfológicas e estruturais de Leishmania sp</i>	3
2.2– <i>As leishmanioses</i>	4
2.3 - <i>Ciclo de vida do parasito</i>	6
.....	7
2.4 - <i>Imunomoduladores</i>	7
2.5 <i>Resposta Imune ao parasito</i>	9
3 – OBJETIVOS	11
4.1 – <i>Objetivo geral</i>	11
4.2 – <i>Objetivos específicos</i>	11
5 – MATERIAL E MÉTODOS	12
5.1 – <i>Animal experimental</i>	12
5.2 – <i>Preparação dos extratos particulados</i>	12
.....	13
.....	13
.....	13
.....	13
5.3 – <i>Dosagem de proteínas do extrato</i>	13
5.4 – <i>Inóculo e coleta das amostras biológicas</i>	14
5.5 – <i>Titulação de anticorpos IgG antiOVA</i>	15
5.6 – <i>Avaliação dos níveis dos subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a</i>	15
5.7 – <i>Determinação dos níveis de mRNA para IFN-γ e IL-4 em esplenócitos</i>	16
5.8 – <i>Análise Estatística</i>	17
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1 – <i>Produção de IgG estimulada por OVA na presença de EPLb ou de EPLc</i>	18
.....	19
.....	19

.....	19
.....	19
.....	19
6.2 – Efeito de EPLb ou de EPLc sobre a produção de IgG1 ou de IgG2a estimulada por OVA.....	20
6.3- Expressão de mRNA para IL-4 e IFN γ em células de baço de camundongos imunizados na presença dos extratos.....	23
7 – CONCLUSÕES.....	26
8 - PERSPECTIVAS.....	27
9 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia de <i>Leishmania</i> sp.....	3
Figura 2 – Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp.....	4
Figura 3 – Esquema didático representando o ciclo da leishmaniose.....	7
Figura 4 – <i>Leishmania</i> antes do choque térmico.....	13
Figura 5 – Extrato particulado de <i>Leishmania</i> após choque térmico.....	13
Figura 6 – Curva de titulação de IgG anti-OVA em soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com EPLb	16
Figura 7 – Curva de titulação de IgG anti-OVA em soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com EPLc.....	17
Figura 8 – Produção de IgG1 anti-OVA.....	19
Figura 9 – Produção de IgG2a anti-OVA.....	20
Figura 10 – Expressão de mRNA para IL-4.....	21
Figura 11 – Expressão de mRNA para IFN- γ	22

RESUMO

VALENTE, Samara Freire, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Perfil de resposta imune induzida por extrato particulado de *Leishmania braziliensis* ou de *Leishmania chagasi* em camundongo C57BL/6.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Co-orientador: Sérgio Oliveira De Paula.

Dentre as diversas diferenças clínicas e laboratoriais nas leishmanioses, uma alteração que se destaca é a hipergamaglobulinemia, que ocorre especialmente nos casos de leishmaniose visceral, causada por *L. chagasi*. Frente à característica desta espécie em ativar inespecificamente clones de linfócitos B, levando à produção indiscriminada de anticorpos, no presente trabalho avaliou-se o efeito da administração de extrato particulado de *L. chagasi* (EPLc) ou de extrato particulado de *L. braziliensis* (EPLb), espécie causadora de leishmaniose mucocutânea, associados ou não a adjuvante incompleto de Freund (AIF) ou a alúmen (ALU), na produção de anticorpos IgG específicos contra ovalbumina (OVA) em soro de camundongos C57BL/6. Além disso, os níveis de mRNA para IFN- γ e IL-4 em esplenócitos dos mesmos animais, estimulados *in vitro* com OVA, com o objetivo de avaliar o perfil de resposta imune induzida pelos extratos. Os resultados obtidos mostraram que: 1. Tanto EPLb como EPLc, na ausência de OVA, induzem produção de IgG anti-OVA superior ao grupo controle (PBS). Porém, os dois extratos diminuíram a produção de anticorpos IgG anti-OVA na presença de outros adjuvantes e OVA, EPLb diminui a produção de IgG na presença de OVA; 2. EPLb diminui os níveis de IgG1 induzida por OVA, o que não ocorre na presença de EPLc; 3. EPLb, na presença de OVA, parece diminuir a produção de mRNA de IL-4 mais acentuadamente que EPLc; 4. Quanto à produção de IFN- γ , os dois extratos tiveram perfis semelhantes entre si, e não foram capazes de induzir uma produção acentuada de mRNA para esta citocina. Essas propriedades imunossupressoras de ambos os extratos, em especial do EPLb, podem ser alvos de estudos futuros em casos em que se deseja uma atenuação dos efeitos causados pela resposta imune, como, por exemplo, em casos de hipersensibilidade.

ABSTRACT

VALENTE, Samara Freire, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Profile of immune response induced for particulate extracts from *Leishmania braziliensis* or *Leishmania chagasi* in C57BL/6 mouse.** Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Co-adviser: Sérgio Oliveira De Paula.

Among the many clinical and laboratory differences observed in leishmaniasis, a change that stands out is the hypergammaglobulinemia that occurs especially during visceral leishmaniasis caused by *L. chagasi*. Faced with the characteristic of this specie in activate B cell clones nonspecifically, leading to indiscriminate production of antibodies, the present study was designed to evaluate the effect of administration of crude extract of *L. chagasi* (EPLc) or *L. braziliensis* (EPLb), a specie which causes mucocutaneous leishmaniasis, associated or not with incomplete Freund's adjuvant (AIF) or alum (ALU), in the production of specific IgG antibodies against ovalbumin (OVA) in C57BL/6 mice. Furthermore the levels of mRNA to IFN- γ and IL4 in spleen cells from the same animals, aiming to evaluate the profile of immune response induced by the extracts. The results showed that: 1. Both EPLb as EPLc, in the absence of OVA, induce higher production of anti-OVA IgG than the control group (PBS). Interestingly, both extracts decrease the production of anti-OVA IgG in the presence of adjuvants and OVA, and only EPLb is able to decrease the production of IgG in the presence of OVA alone; 2. Only EPLb is able to reduce the levels of IgG1 induced by OVA; 3. EPLb, in the presence of OVA, seems to decrease the production of mRNA to IL4 more effectively than EPLc; 4. Considering the production of IFN- γ mRNA, both extracts show the same profile, and are not able to induce a marked production of this cytokine. These immunosuppressive properties of both extracts, particularly EPLb, may be target in future studies, in cases where it is desired to reduce immune system's reactions for mitigate symptoms, for example in hypersensitivity disorders.

1 – INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de vacinas é uma tarefa que requer longos períodos de pesquisas e altos investimentos. Em contrapartida, a vacinação é a forma mais eficaz de erradicar doenças infecciosas. A incorporação de adjuvantes em vacinas possui várias vantagens, como a modificação da natureza da resposta imune ou a otimização da resposta imune desejada, por exemplo, com respeito a um padrão de indução de respostas imune específico e produção de anticorpos que protejam contra o agente infeccioso da vacina.

O interesse em adjuvantes de vacinas aumentou rapidamente por várias razões, dentre elas a necessidade de controlar a indução de respostas imunes apropriadas e reduzir o risco de doenças autoimunes ou reações alérgicas. Há uma necessidade urgente de desenvolver novos adjuvantes bem caracterizados que permitem a ativação imune “sob medida” (MALLAPRAGADA; NARASIMHAN, 2008). Autoridades de saúde pública, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), estabeleceram metas ambiciosas para melhorar vacinas já existentes e para o desenvolvimento de novas. Nos últimos anos, vários candidatos a vacina emergiram contra doenças infecciosas. Novas tecnologias nos campos da bioquímica analítica, purificação macromolecular, tecnologia recombinante, e uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos e patogênese da doença ajudam a melhorar a base técnica para o desenvolvimento e aplicação de adjuvantes (EMEA, 2005).

Dada a sua capacidade imunoestimulante, substâncias derivadas de microorganismos constituem uma importante fonte potencial de adjuvantes. Diferentes microorganismos são usados como uma fonte de adjuvantes, a citar: *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, *C. granulosa*, *Bordetella pertussis* e *Neisseria meningitidis* (PETROVSKY; AGUILAR, 2008; WATERS et al., 1986).

O parasito *Leishmania* sp é uma célula eucariótica que possui em sua composição diversas proteínas, lipídeos e moléculas variadas. Esses componentes estão envolvidos diretamente em uma série de processos biológicos. Algumas dessas moléculas estimulam o sistema imune durante o estabelecimento da doença. Sendo assim, seu uso em benefício da saúde humana, como componente na formulação de adjuvantes em vacinas contra diversos tipos de infecção, é uma possibilidade interessante e inovadora.

A infecção por *L. chagasi* leva a uma ativação policlonal de linfócitos B, aumentando os níveis de anticorpos séricos do indivíduo infectado de forma inespecífica (DEAK *et al.*, 2010). O que nos atenta à possibilidade da utilização de extrato dessa espécie como potencializador ou direcionador de resposta imune humoral específica para antígenos não leishmaniais, o que seria interessante para os casos em que se deseja imunizar indivíduos contra doenças em que a resposta humoral tenha importância para a proteção.

Portanto, o presente trabalho avaliou os perfis de resposta imune humoral (IgG) e celular (IFN γ e IL-4) anti-OVA de camundongos inoculados em extratos de duas espécies de *Leishmania*, com ou sem o estímulo por OVA.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, os imunógenos utilizados nos processos de vacinação passaram a ser produzidos em laboratório em grande escala, gerando produtos mais puros e que causam menores riscos à saúde animal. Apesar destas vantagens encontradas nas moléculas recombinantes, o fato delas apresentarem baixa imunogenicidade preocupa os imunologistas, que passaram a depender muito mais do uso de substâncias adjuvantes, que potencializam e até mesmo direcionam a resposta imune protetora montada contra essas moléculas presentes nos micro-organismos causadores de doenças. Atualmente, a busca por novos adjuvantes que substituam os já existentes, cujos efeitos adversos causam desconforto ou dor ao indivíduo merece destaque. Além disso, composições que acrescentem propriedades aos adjuvantes já conhecidos que possam ser utilizadas para o delineamento racional dos protocolos de vacinação que demandam as mais variadas formas de resposta protetora para as diferentes doenças atraem pesquisadores da área.

Conforme citado anteriormente, extratos de microorganismos foram amplamente estudados e abrem campo para a busca de novos extratos para os diferentes tipos de respostas requeridas nos processos de imunização. A realização deste trabalho se justifica pela falta de publicações relacionadas com a avaliação da utilização de extratos de *Leishmania* como potencializadores ou direcionadores de algum tipo de resposta imune, com o intuito de se utilizar esses extratos como adjuvantes em imunizações.

2 - Revisão de Literatura

2.1 - Características morfológicas e estruturais de *Leishmania* sp

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários do subreino protista, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, que pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Eles compreendem parasitos digenéticos, com uma fase no tubo digestório de insetos vetores, na forma promastigota onde permanecem sob a forma alongada, móvel e flagelada (Figuras 1B e 2B), e uma fase parasita intracelular em hospedeiro vertebrado (forma amastigota), que possui morfologia arredondada e imóvel (Figuras 1A e 2A), e se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (BARI; RAHMAN, 2008)

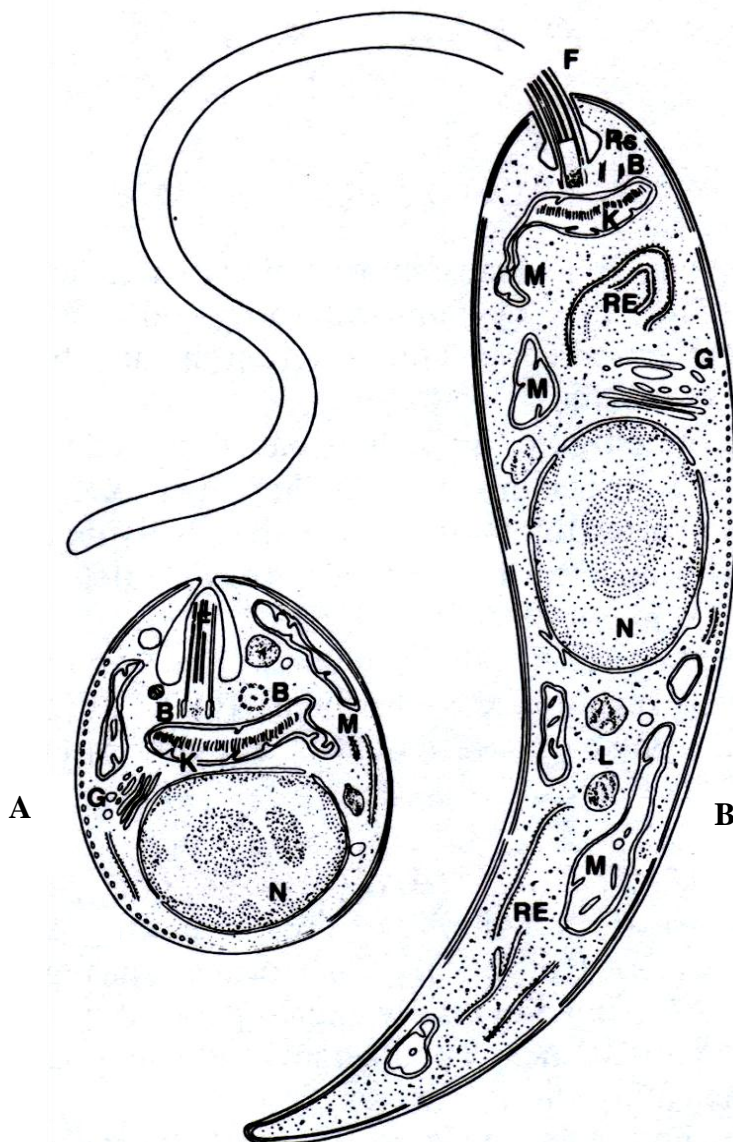


Figura 1 – Morfologia de de *Leishmania* sp – figura esquemática mostrando o núcleo (N), cinetoplasto (K), blefaroplasto (B), flagelo (F) e mitocôndria (Mt) e retículo endoplasmático (RE) das formas amastigota (A) e promastigosta (B). Disponível em: REY, L. – *Bases da Parasitologia*. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

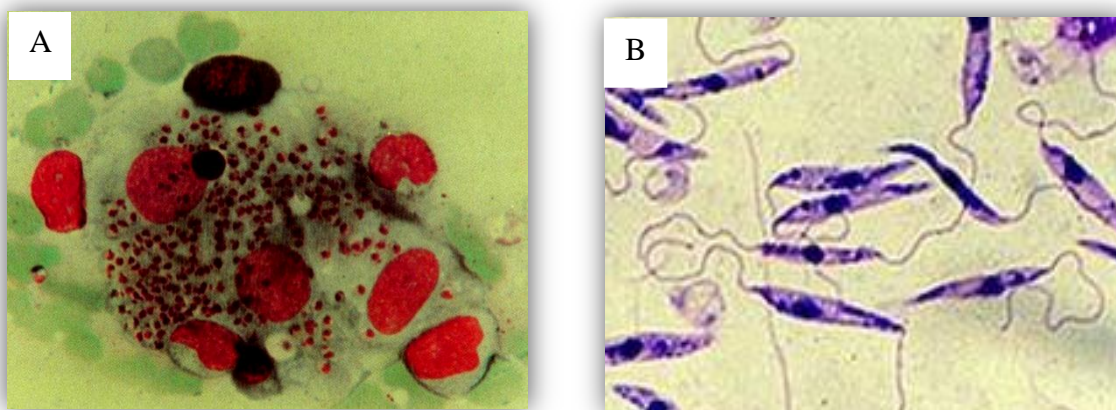


Figura 2 – Formas evolutivas de *Leishmania* sp. Forma amastigota (A) e Forma promastigota (B). Disponível em: REY, L. – *Bases da Parasitologia*. 2 edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002 e GONTIJO; CARVALHO, 2003

Estudos de análise imunoproteômica revelam que, no extrato total do parasito, há presença de fatores de alongamento, proteínas de choque térmico, tais como hsp70, Hsp83, chaperonas, e outras proteínas. (PATERAKI *et al.*, 1983; SHAPIRA *et al.*, 1988). Abordagens proteômicas aplicadas ao estudo de padrão de expressão de proteínas de *Leishmania* oferecem possibilidades para atribuir potenciais funções a essas proteínas. Como previamente identificado em alguns trabalhos, essas funções podem incluir novos marcadores para diagnósticos, candidatos a vacinas e até mesmo potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas (CHENIK *et al.*, 2006; PAAPE *et al.*, 2010).

2.2– As leishmanioses

Leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* após o repasto sanguíneo feito por fêmeas de insetos flebotomíneos. O quadro clínico da doença varia de acordo com a espécie do parasito envolvido. Mais de 20 espécies estão envolvidas com a enfermidade, que varia também de acordo com a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro frente à infecção.

Indivíduos infectados por *L. braziliensis* podem desenvolver lesões em mucosas distantes do local da picada, meses ou anos após a formação da lesão primária na derme, características da leishmaniose mucocutânea. Por sua vez, a leishmaniose visceral ou calazar, causada por *L. chagasi* no Novo Mundo, é uma enfermidade crônica,

caracterizada pela presença de febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, debilidade progressiva e caquexia, e pode, em indivíduos não tratados adequadamente ou com deficiência imunológica, levar a óbito (ASHFORD, 2000). A leishmaniose pode levar a ocorrência de vários sintomas, dentre eles: febre, astenia, fenômenos hemorrágicos, retardo de puberdade, amenorréia, queda de cabelos e alterações nos exames laboratoriais, tais como: pancitopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (BADARO *et al.*, 1986). Esta última alteração é uma característica laboratorial peculiar da leishmaniose visceral clássica em relação às outras formas clínicas viscerais ou cutâneas. Ela é causada pela ativação policlonal de células B, caracterizando-se pela produção de anticorpos IgG e IgM contra antígenos leishmaniais e não leishmaniais (DEAK *et al.*, 2010b), o que leva à produção exagerada de anticorpos pelo hospedeiro, culminando com a inversão do índice albumina/globulina nos exames que avaliam o perfil de proteínas séricas dos indivíduos doentes em relação aos sadios.

Diagnósticos baseados em técnicas sorológicas são facilitados por uma forte resposta humoral que acompanha a infecção por espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). No entanto, o papel dessa forte resposta humoral nos pacientes com calazar, para proteção ou patogênese da doença, ainda não está definido (SHARMA; SINGH, 2009).

Quando a *Leishmania* é inoculada no corpo humano, na forma promastigota metacíclica, um dos seus mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro é evitar a lise direta pelo sistema complemento, o que ocorre com o auxílio de glicoproteínas e açúcares da membrana do parasito, que atuam por fosforilação inativando componentes do complemento como: C3, C5 e C9, com a subsequente inibição das vias clássica e alternativa do complemento. Ao escaparem dos componentes do meio extracelular, os parasitos irão penetrar nas células fagocíticas – macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos – pela interação entre moléculas de superfície do parasito e receptores dessas células. No interior destas células, o parasito assume a forma amastigota. Há uma complexa interação parasito-hospedeiro dentro do microambiente dos fagolisossomos e, eventualmente, os mecanismos imunes de defesa são evadidos (ALEXANDER; RUSSELL, 1992; SACKS; SHER, 2002).

A imunopatogênese da leishmaniose está fortemente associada a dois tipos de respostas imunes: a resposta Th1, que neste caso está relacionada com o controle da infecção e proteção contra a doença, e a resposta Th2, relacionada com o favorecimento

desta doença. Células da resposta Th1 secretam ativadores imunes celulares, tais como IFN- γ , enquanto as células Th2 secretam outras citocinas, como a IL-4, que estimulam a produção de anticorpos (REIS *et al.*, 2010; FERRER *et al.*, 2013).

2.3 - Ciclo de vida do parasito

O ciclo da doença começa quando um flebotomíneo contaminado com o parasito faz repasto sanguíneo e, ao ingerir o sangue do hospedeiro vertebrado, injeta promastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do mesmo. Essas formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e, dentro deles, se transformam em amastigotas que, posteriormente, sofrem divisão binária, rompem os macrófagos e são liberadas para infectar outras células. Assim, dando continuidade ao ciclo, um flebotomíneo não contaminado ingere sangue de um hospedeiro mamífero contaminado. As formas amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas não infectantes no estômago do inseto, onde se multiplicam, se transformam em formas metacíclicas infectantes – processo denominado metaciclogênese – que, presentes nas glândulas salivares, são inoculadas em um hospedeiro vertebrado sadio durante novo repasto sanguíneo (Figura 3).

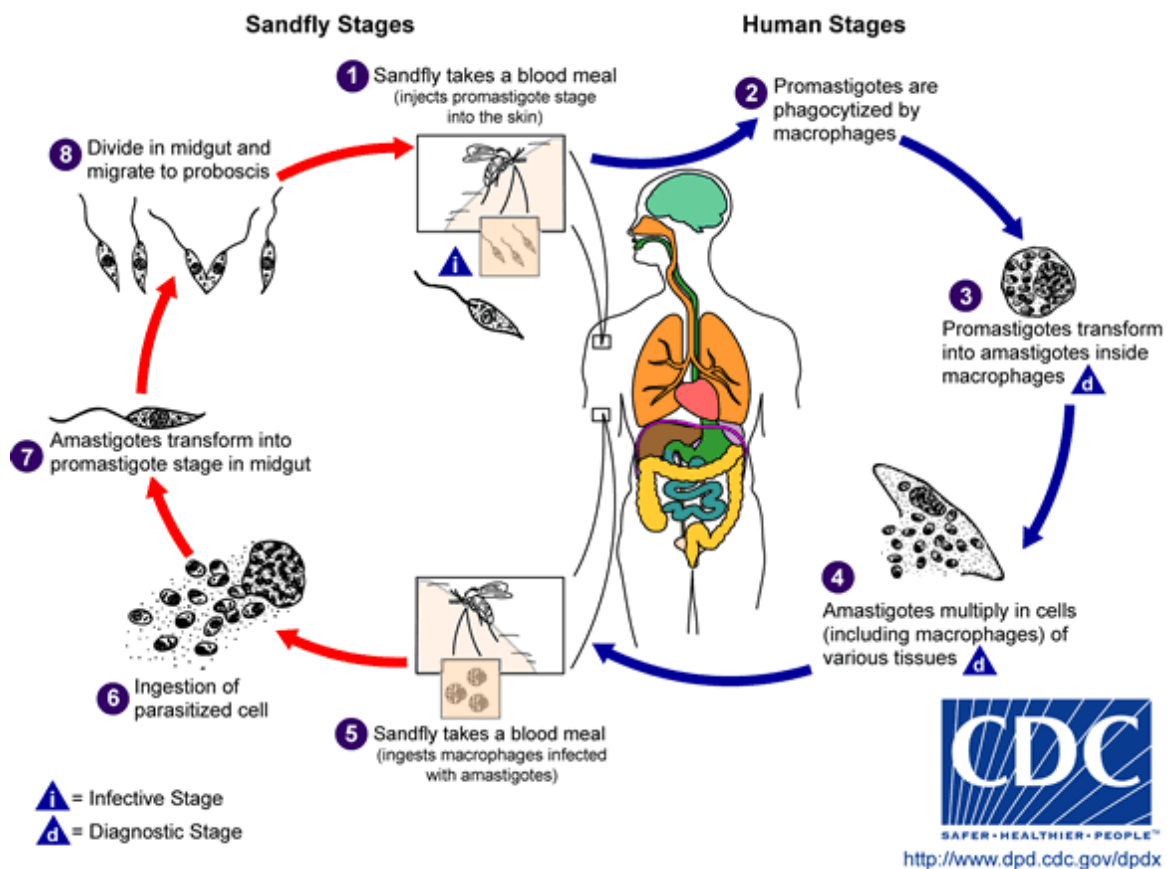


Figura 3 – Ciclo da leishmaniose

2.4 - Imunomoduladores

O desenvolvimento de vacinas representa um marco de grande importância na medicina preventiva. Não há, até agora, meios comparáveis tão eficientes para controlar ou erradicar doenças infecciosas. Dentro deste contexto, os adjuvantes, substâncias capazes de estimular uma resposta imunológica a um antígeno, são essenciais para a eficácia da vacina, pois podem reduzir a dose e o número de imunizações necessárias para atingir imunidade protetora e eficaz. Atualmente, a seleção de adjuvante é amplamente empírica (GHOSH SK, 2013; HALPERIN *et al.*, 2006; BOYLE *et al.*, 2007).

Para facilitar o entendimento sobre os adjuvantes, criou-se um sistema de classificação que subdivide essas substâncias nos seguintes grupos: Agentes microbianos, emulsões em óleo, agentes tensoativos, adjuvantes particulados, proteínas fusionadas, adjuvantes baseados em gel e lipopeptídeos (JENNINGS *et al.*, 1998).

A utilização de substâncias adjuvantes permite a formação de uma resposta imune mais rápida, mais intensa, de maior duração e a utilização de uma quantidade menor de imunógeno, possibilitando melhores resultados nas imunizações e diminuição dos custos na produção de vacinas. Este aspecto é importante para a produção de vacinas de combinações, onde, com o uso de substâncias adjuvantes, a quantidade do antígeno a ser utilizada pode ser diminuída. Outra propriedade importante dos adjuvantes é sua capacidade de direcionamento da resposta imune, ou seja, a capacidade de fazer sobressair uma resposta humoral ou celular (Th2 ou Th1) respectivamente, ou até mesmo uma resposta mista, contra o imunógeno (REED *et al.*, 2009). O controle deste direcionamento é importante para o delineamento de vacinas para as diferentes doenças, que requerem diferentes perfis de resposta montada pelas células imunológicas do hospedeiro (GONZALO *et al.*, 2001; FACHADO *et al.*, 2003).

O alumínio é o adjuvante mais comumente utilizado em todo o mundo. Ele já foi usado com sucesso em vacinas ministradas a centenas de milhões de seres humanos desde 1932, o que contribuiu com uma significativa diminuição da morbidade e da mortalidade causadas por várias doenças, como o tétano e a difteria. É importante ressaltar que o uso deste composto é favorecido por ele apresentar toxicidade mínima (MARRACK *et al.*, 2009). Seu uso implica principalmente na indução de resposta imune humoral, com favorecimento da resposta Th2 em murinos e Th2 associada a Th1 em humanos (COFFMAN *et al.*, 2010). Os mecanismos de estímulo de resposta imune pelo alumínio ainda são desconhecidos, porém, estudos feitos com o inflamassoma Nalp3 (ou criopirina) implicam este sistema no processo de ativação da resposta imune inata pelos adjuvantes de alumínio (EISENBARTH *et al.*, 2008).

Os micro-organismos, mesmo quando inativados, podem influenciar a resposta imune, e isso pode ser explorado de maneira positiva na elaboração de novas terapias para tratamento de doenças. Um adjuvante descoberto em 1937 e hoje conhecido por induzir fortes respostas Th1 e Th17 é o adjuvante completo de Freund (ACF), que tem em sua composição a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, morta por aquecimento, associada a óleo mineral e substância surfactante. Os efeitos do ACF na resposta imune celular são dependentes de sinalização intracelular via MyD88 (EISENBARTH *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2005), mas seus efeitos na resposta imune humoral, diferentemente do que ocorre com os sais de alumínio, são independentes do inflamassoma (EISENBARTH *et al.*, 2008; GAVIN *et al.*, 2006). Porém, os efeitos adversos decorrentes da forte resposta inflamatória gerada em grande parte pela ação dos

componentes bacterianos do ACF dificultam sua utilização experimental em animais experimentais e impedem seu uso em humanos (GUPTA *et al.*, 1993). Uma alternativa para o uso do ACF é a retirada do componente bacteriano de sua formulação, a partir da qual ele passa a se chamar adjuvante incompleto de Freund (AIF). Este último é um adjuvante menos efetivo na indução de produção de anticorpos e no estímulo de resposta imune mediada por células que o ACF, porém, sua baixa toxicidade aliada a seus efeitos adjuvantes, ainda que menos intensos, são válidos para seu uso em humanos em substituição ao ACF ou como doses de reforço em que se utiliza o ACF em imunização primária em animais de laboratório (JENNINGS, 1995).

A formulação de adjuvantes com capacidade para induzir alta produção de anticorpos de elevadas afinidade proporcionaria um avanço importante no desenvolvimento de vacinas para as mais diversas infecções. Embora o adjuvante de Freund seja eficaz, a exagerada inflamação decorrente de sua utilização o torna inaceitável para utilização humana (LAI *et al.*, 2012). Mais recentemente, a mistura de diferentes adjuvantes na mesma formulação tem sido usada para aumentar a potência e o tipo de resposta imune ao antígeno vacinal (MAZLOOMI *et al.*, 2012).

Por outro lado, os imunossupressores são imunomoduladores que diminuem a resposta imune, e assim como os adjuvantes são ferramentas muito importantes. Os anti-inflamatórios fazem parte desse grupo e são empregados em quadros de doença autoimune, como alergias. Os imunossupressores também são fundamentais em casos de transplantes, para evitar rejeição de órgãos.

2.5 Resposta Imune ao parasito

A imunidade protetora na Leishmaniose está relacionada à indução de linfócitos T produtores de citocinas do tipo Th1 que ativam mecanismos microbicidas de macrófagos mediados principalmente por óxido nítrico. Outro fator importante no estabelecimento de uma resposta Th1 ou Th2 são as citocinas locais presentes nas primeiras horas de infecção (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Está agora bem estabelecido que uma resposta imunitária protectora tanto contra a leishmaniose cutânea, causada por *L. major*, *L. mexicana* ou *L. amazonensis*, bem como a leishmaniose visceral causada por *L. donovani* é dependente do desenvolvimento de uma potente resposta do tipo Th1, no entanto a resposta Th2 também pode estar relacionada em um sentido favorável a resistência, sabe-se que um misto de resposta

Th1 e Th2 é importante para essa resposta favorável ao controle da doença e que apenas uma resposta forte Th1 pode não ser suficiente (BIEDERMANN *et al.*, 2001).

Estudos mostraram que camundongos deficientes na produção de IL-4, uma citocina secretada por células Th2, são de fato mais suscetíveis à leishmaniose do que os seus tipos selvagens. Além disso, mostrou-se que enquanto a cura em modelos susceptíveis, como BALB/c, é dependente de IL-12, uma citocina do secretada por células Th1, esta mesma citocina também demonstrou promover o desenvolvimento de resposta Th2, bem como a resposta Th1 (ENGWERDA *et al.*, 1998).

O estudo de padrões diferenciais de isotipos de imunoglobulinas observadas durante a progressão da leishmaniose cutânea, período de tratamento e cura foram específicos para os antígenos do parasito. A análise das subclasses de IgG revelou expressão de várias subclasses de anticorpos, com predominância de IgG1 durante a doença (ANAM *et al.*, 1999).

As células Th17 representam um subconjunto de células T descrito recentemente, caracterizada pela produção de IL-17, essas células desempenham um papel crucial na auto-imunidade e doenças inflamatórias crônicas e participam nos mecanismos de defesa contra certos patógenos, incluindo *L.donovani*. Além disso, a IL-17 está associada a intensidade de infiltração e patogênese da leishmaniose cutânea (BACELLAR *et al.*, 2009; KHADER; GOPAL, 2010).

3 – OBJETIVOS

4.1 – Objetivo geral

Avaliar o perfil de resposta imune específica anti-OVA induzida por extrato particulado de *Leishmania braziliensis* ou de *L. chagasi* em camundongos C57BL/6.

4.2 – Objetivos específicos

Avaliar o nível e a especificidade de resposta imune humoral anti-OVA induzida por extratos particulados de *L. braziliensis* ou de *L. chagasi*, associados ou não a adjuvante incompleto de Freund ou a alúmen, na imunização com antígeno OVA, por intermédio da determinação de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2A anti-OVA em soro de camundongos imunizados, utilizando a técnica de ELISA;

Analisar o perfil de resposta imune induzida por extratos particulados de *L. braziliensis* ou de *L. chagasi*, associados ou não a adjuvante incompleto de Freund ou a alúmen, na imunização com OVA, por intermédio de titulação de anticorpos IgG total e dosagem de IgG1 e IgG2a anti-OVA em soro de camundongos imunizados, utilizando a técnica de ELISA;

Verificar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) para citocinas Th1 e Th2 (IFN- γ e IL-4, respectivamente) em esplenócitos estimulados “*in vitro*” com OVA de camundongos previamente imunizados com OVA e extratos particulados de *L. braziliensis* ou de *L. chagasi*.

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – *Animal experimental*

Camundongos C57BL/6 foram obtidos no Biotério Central da UFV e manuseados no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, onde receberam água e alimento *ad libitum*. A experimentação animal foi feita respeitando princípios éticos do Código de ética, de acordo com o parecer da Comissão de ética para Uso de Animais, número do processo: CEUA/UFV:68/2012.

5.2 – *Preparação dos extratos particulados*

Utilizaram-se as cepas *L. (Viannia) braziliensis* (M2903 - MHOM/BR/75/M2903) e *L. (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/75/M2682), as cepas foram gentilmente cedidas pela Prof. Maria Norma Melo - Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Formas promastigotas do parasito foram cultivadas partindo de cultura com 10^5 células/mL em meio de Grace (SIGMA, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - LGC BIOTECNOLOGIA, Cotia, SP, BR) a 25 °C. O extrato particulado de cada espécie de *Leishmania* foi preparado a partir de parasitos provenientes de cultura em final de fase logarítmica de crescimento (dia 5), conforme mostrado na figura 4, os quais foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e submetidos a choque térmico (7 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C) para rompimento das estruturas de membrana, conforme mostrado na figura 5.

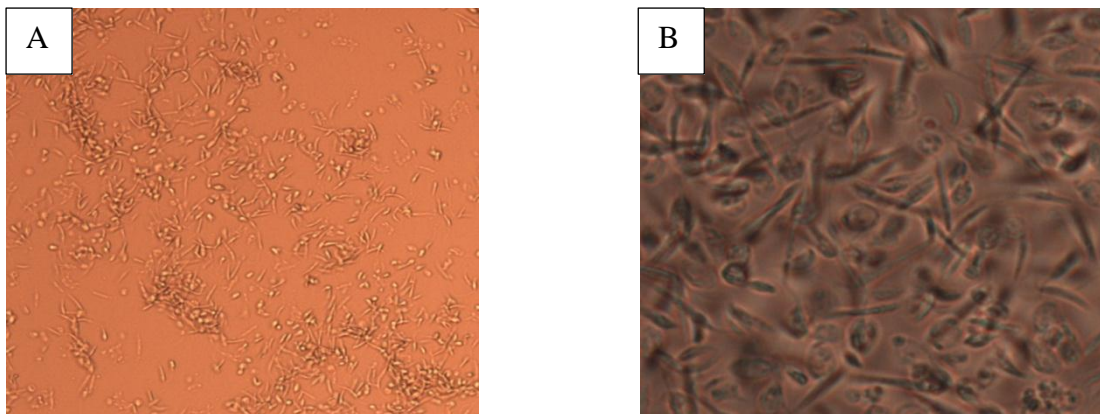


Figura 4 - *Leishmania* antes do choque térmico. Aumento de 10X (A) e 40X (B).

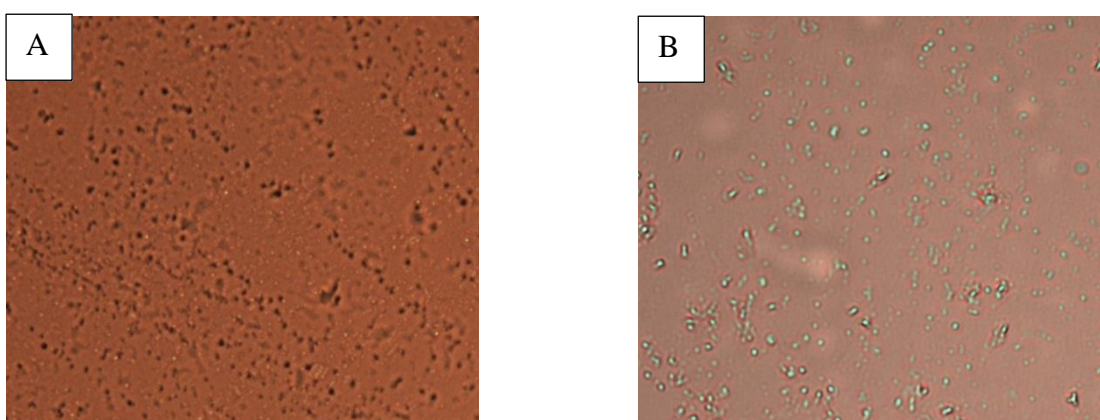


Figura 5 – Extrato particulado de *Leishmania* após choque térmico. Aumento de 10X (A) e 40X (B).

5.3 – Dosagem de proteínas do extrato

A determinação de proteínas solúveis do extrato particulado de *Leishmania* foi feita utilizando o método de Bradford, com o uso do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 (BioAgency - São Paulo - SP). Como padrão foi utilizada a proteína albumina bovina sérica (BSA - Pierce, Rockford, Illinois, USA) diluída em PBS nas seguintes concentrações: 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 15,5 e 0 $\mu\text{g/mL}$. Após a dosagem de proteínas, uma alíquota foi submetida à caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A análise da fração foi realizada em sistema “Mini Protein III System” (Biorad), em gel de poliacrilamida (30% acrilamida e 0,8% bisacrilamida), utilizando tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 com 4% de SDS e 20% de glicerol. Utilizou-se padrões de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific),

a coloração do gel foi realizada com solução de Coomassie coloidal (Coomassie Brillante Blue G-250 – Amersham Bioscience), até visualização total das bandas.

5.4 – Inóculo e coleta das amostras biológicas

Camundongos C57BL/6 foram inoculados por intermédio de injeções de 200 μ L pela via intraperitoneal na imunização primária, seguida de duas doses de reforço em intervalos de 15 dias, nas mesmas condições da primeira dose. A tabela abaixo representa os grupos utilizados assim como o volume de cada componente recebido por animal.

Grupos	PBS (μ L)	OVA (μ L)	Extrato (μ L)	Óleo Mineral (μ L)	Alúmen (μ L)
PBS	200	-	-	-	-
OVA	150	50	-	-	-
Extrato	150	-	50	-	-
Ova + Extratos	100	50	50	-	-
Ova+AIF	100	50	-	50	-
Ova+ALU	50	50	-	-	100
Ova+Extrato+Alu	-	50	50	-	100
Ova+Extrato+AIF	50	50	50	50	-

As quantidades inoculadas em cada animal foram: OVA (10 μ g), extrato (100 μ g em proteínas), alúmen (1,5 mg) e óleo mineral (ou AIF) (50 μ L), sempre em volume final de 200 μ L em PBS. Após 45 dias da imunização primária, os animais foram sacrificados, o sangue foi coletado da cavidade torácica para dosagem de anticorpos e o baço foi retirado para determinação dos níveis de mRNA para IFN- γ e IL-4, conforme descrito no item 5.7.

5.5 – Titulação de anticorpos IgG antiOVA

Placas de fundo chato de 96 poços foram sensibilizadas com solução de OVA em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (1µg/poço), durante a noite a 4°C. Posteriormente, o conteúdo das placas foi descartado para bloqueio com solução de 5% de gelatina, por 30 minutos em temperatura ambiente. Novamente o volume foi descartado e as placas foram lavadas com tampão PBS contendo 1% de Tween 20. Acrescentaram-se amostras de soro diluídas seriadamente em gelatina 1%, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas. Após três repetidas lavagens, foi acrescentado o anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase, diluído conforme recomendação do fabricante (SIGMA). O material foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente e, após cinco lavagem sucessivas, foi acrescentada solução reveladora 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB – SIGMA) em tampão Citrato. A revelação foi interrompida com acréscimo de solução de H₂SO₄ 2M. A leitura da intensidade de cor foi realizada sob comprimento de onda de 450 nm.

5.6 – Avaliação dos níveis dos subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a

Os anticorpos IgG1 e IgG2a no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais foram dosados pela técnica de ELISA. Resumidamente, placas de fundo chato de 96 poços foram cobertas com OVA. As amostras de soro foram diluídas 1:40. Para o reconhecimento dos anticorpos IgG1 ou IgG2a, foram utilizados os anticorpos anti-IgG de camundongo produzido em coelho, anti-IgG1 de camundongo produzido em cabra ou anti-IgG2a de camundongo produzido em cabra, conjugados com peroxidase (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc., Santa cruz, CA, USA). Após nova etapa de lavagem o substrato tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado por 10 minutos e a leitura realizada a 450 nm.

5.7 – Determinação dos níveis de mRNA para IFN- γ e IL-4 em esplenócitos

Para a cultura de células esplênicas, o baço foi retirado em fluxo laminar. Sob condições de esterilidade, o baço foi macerado com pinças em RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) com 1% de SFB, células provenientes foram centrifugadas a 170 x g a 4°C por 10 minutos, eliminando-se o sobrenadante e incubando o sedimento com tampão de lise, por dois minutos no gelo, sendo submetido a um novo ciclo de centrifugação após a adição de meio de cultura RPMI suplementado com 5% de SFB. O *pellet* foi ressuspensão em 1 ml de RPMI completo (10% de SFB). As células brancas purificadas foram contadas em solução de azul de Trypan a 4% (v/v) e a concentração de células viáveis foi ajustada para 1×10^5 /mL na presença (5 μ g por poço) ou ausência de OVA em meio RPMI completo, as placas foram colocadas em estufa com atmosfera úmida a 37 ° C com 5% de CO₂.

O meio completo é composto de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10 mM de tampão HEPES. Para enriquecê-lo, adicionamos soro fetal bovino previamente inativado pelo calor (56°C/45 minutos) a 10% (v/v).

A cultura foi incubada em estufa por 4 horas. Após esse período, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com pipeta e adicionou-se TRI reagente (SIGMA) às células. As amostras foram colocadas no freezer -80°C até o momento da extração de mRNA, que foi feita de acordo com as orientações do fabricante. Após a extração de mRNA, que foi feita utilizando-se “pool” das amostras dos três camundongos de cada grupo, fez-se a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA). Este foi analisado quanto à expressão de IFN- γ e IL-4 por intermédio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR). O procedimento de PCR em Tempo Real, bem como testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo manuais da Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Usou-se o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o primer específico para o gene endógeno β -actina. Os dados de expressão dos esplenócitos que

receberam estímulo com OVA foram trabalhados por fórmula no excel, para um resultado dos índices de expressão gênica em relação ao controle endógeno e também, em relação aos níveis de mRNA para estas citocinas dos esplenócitos que não receberam estímulo *in vitro* com OVA. É importante mencionar que como foi utilizado um *pool* de amostras não foi possível realizar análise estatística dos dados referentes aos níveis de mRNA para estas citocinas.

5.8 – Análise Estatística

Os dados foram sistematizados no software Graph pad Prism® utilizando-se o Teste t de Student, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Produção de IgG estimulada por OVA na presença de EPLb ou de EPLc

O EPLb, quando administrado na presença dos adjuvantes (AIF ou alúmen) e OVA, diminuiu a produção de IgG anti-OVA, até o título 160.000. Além disso, o mesmo extrato reduziu a produção de IgG induzida por OVA quando testada no título 40 (Figura 6). O EPLc tende a diminuir os níveis de IgG anti-OVA na presença dos adjuvantes no título 10 (Figura 7).

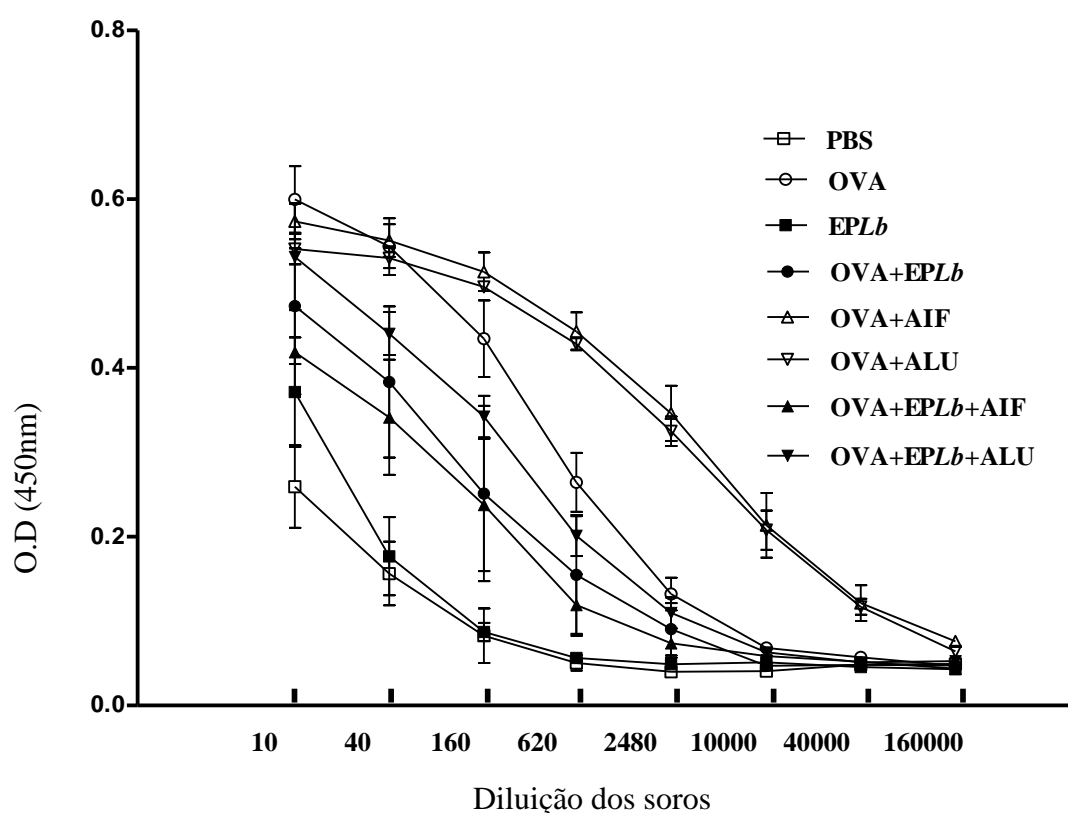


Figura 6 – Curva de titulação de IgG anti-OVA em soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com EPLb. Os camundongos foram divididos em 8 grupos inoculados com: PBS (PBS), Ovalbumina (OVA), Extrato particulado de *Leishmania braziliensis* (EPLb), Ovalbumina mais extrato (OVA + EPLb), OVA + adjuvante incompleto de Freud (OVA + AIF), Ova + alúmen (OVA + ALU), Ova + extrato + alúmen (OVA + EPLb + ALU) e Ova + extrato + AIF (OVA + EPLb + AIF). Após realizado o protocolo de imunização, conforme descrito na metodologia, anticorpos IgG anti-OVA foram medidos no soro dos animais pela técnica de ELISA. Foram usados três camundongos por grupo. As barras representam a média + desvio padrão dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes, com 3 animais por grupo.

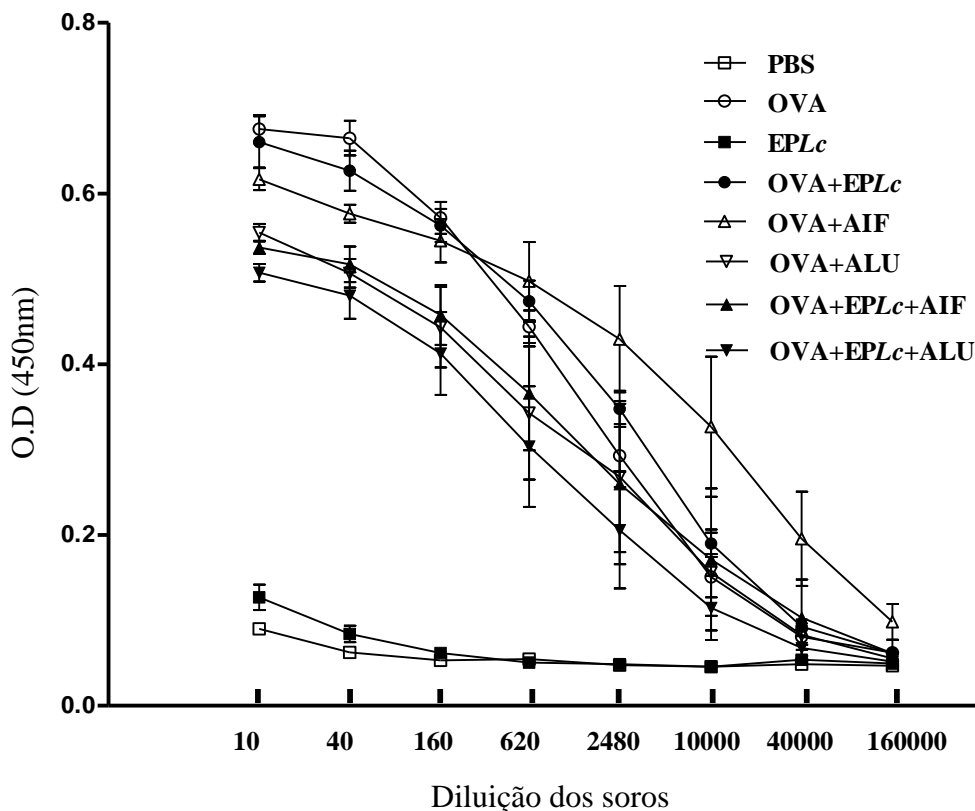


Figura 7 - Curva de titulação de IgG anti-OVA em soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com EPLc. Os camundongos foram divididos em 8 grupos inoculados com: PBS (PBS), Ovalbumina (OVA), Extrato particulado de *Leishmania chagasi* (EPLc), Ovalbumina mais extrato (OVA + EPLc), OVA + adjuvante incompleto de Freud (OVA + AIF), Ova + alumínio (OVA + ALU), Ova + extrato + alumínio (OVA + EPLc + ALU) e Ova + extrato + AIF (OVA + EPLc + AIF). Após realizado o protocolo de imunização, conforme descrito na metodologia, anticorpos IgG anti-OVA foram medidos no soro dos animais pela técnica de ELISA. Foram usados três camundongos por grupo. As barras representam a média + desvio padrão dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes, com 3 animais por grupo.

Esses resultados demonstram um potencial imunomodulador dos extratos. É interessante mencionar que estudos mostram que os modelos murinos podem responder de forma diferente a uma mesma espécie de *Leishmania*, a linhagem de camundongos usada neste estudo, C57BL/6, desenvolve uma resposta Th1 na qual os linfócitos produzem altos níveis de $IFN\gamma$ e por isso são resistentes à infecção por *Leishmania major*, outra linhagem murina, a BALB/c é muito susceptível a essa espécie de *Leishmania*, desenvolvendo uma resposta fatal (AFONSO; SCOTT, 1993; BARRAL et al., 1983). Para detalhamento desta análise e para continuidade da avaliação do perfil de resposta imune induzida pelos mesmos, foi realizada a análise da produção de IgG1 e IgG2a no soro dos animais dos grupos.

6.2 – Efeito de *EPLb* ou de *EPLc* sobre a produção de *IgG1* ou de *IgG2a* estimulada por *OVA*

Tanto *EPLc* quanto *EPLb* induziram uma produção maior de *IgG1* anti-*OVA* comparada à do grupo controle (PBS) (Figura 8), o que demonstra que houve uma produção de anticorpos anti-*OVA* nos grupos que receberam apenas extrato. Este resultado pode estar evidenciando um efeito biológico do extrato na ativação de linfócitos B policlonais. Essa informação corrobora dados da literatura que relacionam infecção por *L. chagasi* com a ativação policlonal inespecífica de linfócitos B (DEAK *et al.*, 2010).

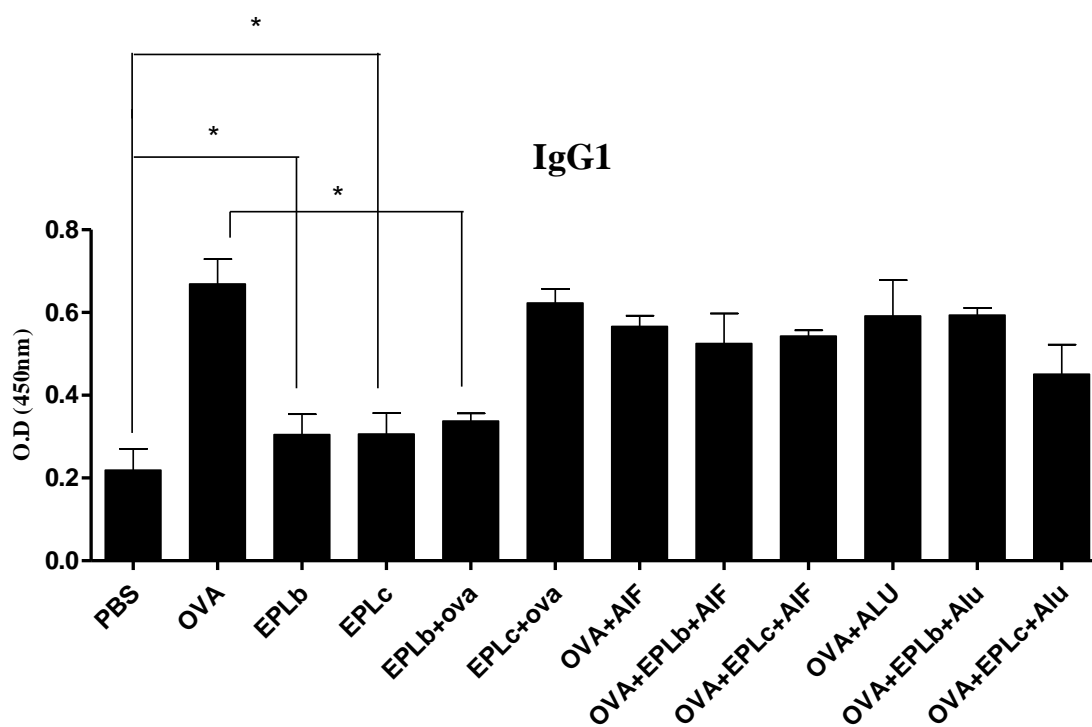


Figura 8 – Produção de *IgG1* anti-*OVA*. Camundongos foram imunizados conforme descrito nas figuras 6 e 7. Após realizado o protocolo de imunização, conforme descrito na metodologia, anticorpos *IgG1* anti-*OVA* foram medidos no soro diluído 1:40 pela técnica de ELISA. Foram usados três camundongos por grupo. As barras representam a média + desvio padrão dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes, com 3 animais por grupo.

Observou-se, também, que o *EPLb* diminuiu a produção de *IgG1* induzida por *OVA*, o que não ocorreu na presença de *EPLc* (Figura 8). Estes resultados indicam que

EPLb inibe a resposta humoral anti-OVA, já que IL-4 é um importante fator de mudança de classe para IgG1 (ISAKSON *et al.*, 1982). Há duas explicações possíveis para esta ação imunossupressora do extrato particulado: primeiro, componentes responsáveis pelo aumento da produção de anticorpos em leishmanioses podem estar presentes na forma amastigota do parasito e não na promastigota, que é a forma do parasito no inseto vetor. Na literatura, a utilização de estratégia do proteoma comparativo por intermédio de gel bidimensional (2D-SDS PAGE) mostra diferenças nas massas moleculares e nos perfis de bandas obtidas entre extratos de formas amastigotas e promastigotas da mesma espécie de *Leishmania* (COELHO *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se que estudos de formas amastigotas para o desenvolvimento de vacinas é mais demorado e de baixo rendimento devido à sua obtenção a partir de lesões ou por cultivo *in vitro* em linhagens de macrófagos. Em conjunto com essa limitação, há o problema da contaminação do extrato de amastigotas com componentes do hospedeiro. Por isso, inclusive estudos sobre a identificação de alvos de drogas em formas amastigotas de *Leishmania* spp são limitados (KUMARI *et al.*, 2012). Segundo, componentes imunostimuladores presentes no parasito podem ter sua ação neutralizada por componentes imunomoduladores, já que se trata de um extrato total. Em estudos com isolados clínicos de *Leishmania donovani*, feitos por intermédio de técnicas metabolômicas de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa, observa-se que a maior classe de metabólitos identificada foi a dos lipídios (ZHENG *et al.*, 2010). Estudos recentes feitos *in vitro* demonstram que lipofosfoglicano e glicoinositolfosfolipídeos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* têm função inibidora sobre a resposta imunológica (ASSIS *et al.*, 2012). A composição lipídica presente neste extrato também poderia interferir de outra maneira, pois se sabe que a interação entre lipídeos e proteínas pode modificar proteínas estrutural e funcionalmente (COSKUN; SIMONS, 2011). Interessantemente, este resultado, principalmente pelo fato que os extratos por si só foram capazes de induzir produção de IgG1 anti-OVA maior que a do grupo PBS, ou seja, este aumento de produção de anticorpos deveria ser mantido quando *EPLb* fosse adicionado na presença de OVA em relação ao grupo tratado com OVA. Possivelmente, algum componente presente no *EPLb* (e ausente no *EPLc*) estaria prejudicando o processo de ativação de linfócitos B anti-OVA quando o referido extrato fosse administrado juntamente com o antígeno. Tal hipótese necessita de posterior avaliação.

A presença de EPLc na preparação OVA + ALU levou à diminuição da produção de IgG2a (Figura 9) comparada à do grupo que recebeu apenas OVA e alumínio, o que demonstra uma ação imunomoduladora deste extrato. A presença de EPLc na preparação OVA + AIF apresentou perfil semelhante ao observado no grupo que não recebeu extrato ($P = 0,06$). É provável que o adjuvante esteja potencializando a resposta inibidora ocasionada pelo extrato. Em conjunto, estes resultados podem estar associados a uma maior capacidade dos componentes da *Leishmania chagasi* de suprimir uma resposta do tipo Th1. Essa supressão da resposta imune celular, somada a uma forte resposta humoral, é associada, na leishmaniose, à persistência e exacerbação da doença (BRACHELENTE *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que camundongos nocauteados para IgG1 são mais resistentes à infecção por *L. mexicana*, espécie relacionada com leishmaniose cutânea. Além disso, esses camundongos sem IgG1 produzem mais IgG2a que camundongos selvagens (CHU *et al.*, 2010).

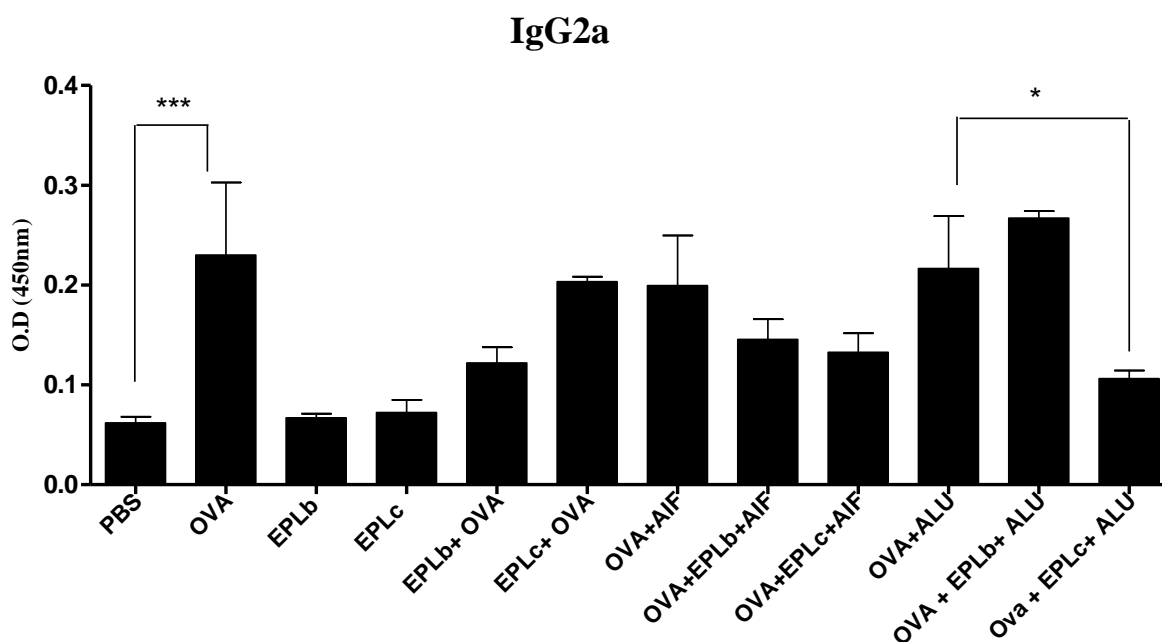


Figura 9 – Produção de IgG2a anti-OVA. Camundongos foram imunizados conforme descrito nas figuras 6 e 7. Após realizado o protocolo de imunização, conforme descrito na metodologia, anticorpos IgG2a anti-OVA foram medidos no soro diluído 1:40 pela técnica de ELISA. Foram usados três camundongos por grupo. As barras representam a média + desvio padrão dos dados de experimento representativo de dois experimentos diferentes, com 3 animais por grupo.

Outro ponto que deve ser mencionado se refere ao efeito dos adjuvantes (AIF e ALU) nos grupos que receberam OVA e adjuvante em relação aos grupos que receberam apenas OVA. Os adjuvantes não aumentaram a produção de IgG1 ou IgG2a anti-OVA. É provável que a quantidade de adjuvante inoculada tenha sido insuficiente para estimular a produção desses anticorpos.

6.3- Expressão de mRNA para IL-4 e IFN γ em células de baço de camundongos imunizados na presença dos extratos

Na avaliação da expressão gênica de IL-4, citocina referida como marcador de resposta Th2, observou-se que EPLc juntamente com OVA estimulou uma maior produção de mRNA para IL-4 que EPLb, ambos apresentando uma diminuição na indução de expressão de mRNA para esta citocina em relação à do grupo OVA. Tais resultados corroboram os dados observados na verificação dos níveis de IgG1 induzidos pelos dois extratos na presença de OVA (Figura 8), já que é demonstrado na literatura que IL-4 está relacionada diretamente com a mudança de classe para IgG1 (ISAKSON *et al.*, 1982).

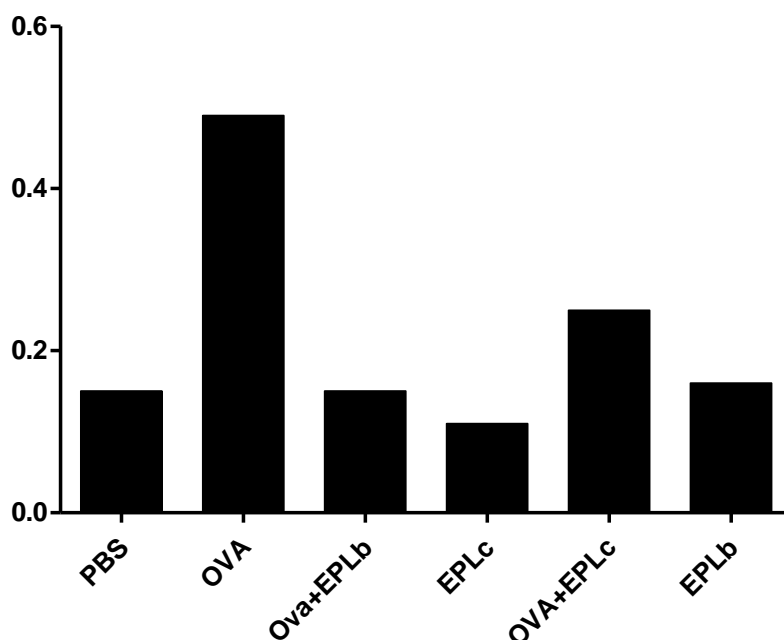


Figura 10 – Expressão de mRNA para IL-4. Esplenócitos camundongos imunizados conforme descrito nas figuras 6 e 7 foram estimulados ou não com OVA, conforme descrito na metodologia. O cálculo da expressão gênica das células estimuladas foi feito em relação à expressão do controle endógeno (β -actina) e à expressão de IL-4 das células que não receberam estímulo, como descrito na metodologia. As barras representam “pool” de esplenócitos de três animais por grupo provenientes de um experimento. Todos os níveis de expressão, são em relação ao controle endógeno β -actina e também em relação aos esplenócitos que não receberam estímulo com OVA.

Interessantemente, quando se avaliou a expressão de mRNA para IL4 nos esplenócitos de camundongos que foram imunizados apenas com extrato (Figura 10), observou-se que os dois extratos apresentam perfis semelhantes entre si e não induzem alterações nos níveis de mRNA em relação ao grupo controle (PBS), o que diverge do observado para a produção de IgG1 (Figura 8). É provável que o aumento da produção de IgG1 em relação ao grupo controle esteja relacionado com a citocina IL-6, já que dados da literatura relacionam essa citocina com a mudança de classe para IgG1 (KAWANO *et al.*, 1994).

A avaliação da expressão gênica de IFN γ (Figura 11) mostra que os extratos não induziram uma maior produção dessa citocina em relação ao grupo controle (PBS), e que tanto EPLb quanto EPLc na presença de OVA parecem diminuir a expressão dessa citocina em relação ao grupo que recebeu apenas OVA, como foi usado um “pool” de amostra não foi possível realizar análise estatística, porém essa diferença observada visualmente no gráfico, não foi capaz de influenciar na diminuição efetiva de IgG2a, conforme se pode observar na Figura 9, onde os grupos EPLb + OVA e EPLc + OVA não apresentam valores de IgG2a significativamente menores que os do grupo OVA. É importante salientar que esta citocina está diretamente relacionada com a mudança de classe para IgG2a (SNAPPER; PAUL, 1987).

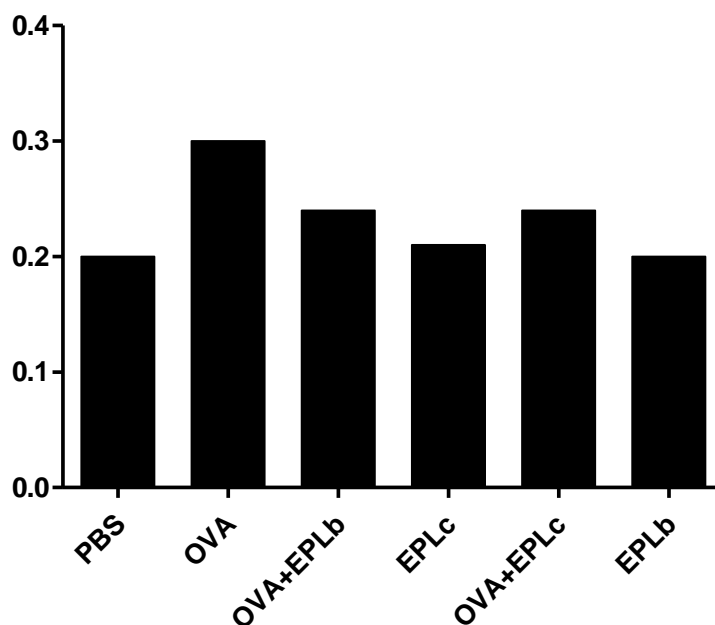


Figura 11 – Expressão de mRNA para IFN- γ . Esplenócitos camundongos imunizados conforme descrito nas figuras 6 e 7 foram estimulados ou não com OVA, conforme descrito na metodologia. O cálculo da expressão gênica das células estimuladas foi feito em relação à expressão do controle endógeno (β -actina) e à expressão de IFN- γ das células que não receberam estímulo, como descrito na metodologia. As barras representam “pool” de esplenócitos de três animais por grupo provenientes de um experimento.

Estudos adicionais aos resultados obtidos aqui, devem ser direcionados para a necessidade de usar frações purificadas, são importantes para identificar proteínas específicas às quais podem ser atribuídos efeitos imunomoduladores.

Após a análise de todos os resultados, constata-se que a busca por novas formulações de adjuvantes é trabalhosa, e existe uma infinidade de composições diferentes no parasito *Leishmania* que podem ser testados, e não é possível saber, *a priori*, qual delas é mais eficiente. Este trabalho enriquece a literatura sobre o assunto, e gera a possibilidade de que, na continuidade das pesquisas aqui relatadas, formulações de adjuvantes ou imunomoduladores sejam mais eficientemente desenvolvidas.

7 – CONCLUSÕES

- Tanto *EPLb* quanto *EPLc* apresentam atividade imunomoduladora frente à imunização com OVA;
- Tanto *EPLb* quanto *EPLc* induzem uma produção de IgG1 maior que o grupo controle (PBS), demonstrando seu efeito na ativação policlonal inespecífica de linfócitos B;
- *EPLb*, na presença de OVA, induz diminuição de IgG1 anti-OVA, o que não ocorre com *EPLc*. Esses dados, corroborados com a expressão de mRNA de IL4, evidenciam o papel modulador de *EPLb* para resposta Th2;
- *EPLc* diminui a produção de IgG2a somente nos grupos que receberam OVA e alúmen, enquanto *EPLb* não exerceu influência evidente sobre a produção de IgG2a. Os dois extratos parecem não influenciar significativamente a produção de IFN γ . Juntos, estes resultados indicam que esses extratos não exercem influência na resposta Th1.

8 - PERSPECTIVAS

O desafio agora é caracterizar os mecanismos moleculares que podem resultar em estratégias racionais que conduzem a novas terapias. Essas propriedades imunossupressoras de ambos os extratos, em especial do EPLb, podem ser alvo de estudos futuros em casos que se deseja uma atenuação dos efeitos causados pela resposta imune.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se a continuação dos experimentos com formulações de imunossupressores ou adjuvantes baseadas em *Leishmania*, uma vez que a ação adjuvante pode ser mascarada por outros componentes do parasito. Na continuação dos trabalhos devem-se testar componentes purificados, além de variar a composição do antígeno (OVA), a concentração do extrato particulado e também analisar os soros dos animais durante o tratamento.

É interessante testar componentes da forma amastigota, que é realmente responsável pela patogênese da doença e, portanto, pode ser fonte de reservatório de antígenos imunoestimulantes, o que seria interessante também para a compreensão de mecanismos que levam à exacerbada produção de anticorpos por organismos infectados pela *L. chagasi*.

É necessário avaliar a origem da mudança de classe para IgG1 quando o EPLb é administrado juntamente com OVA, visto que os níveis de IL-4 não foram alterados sob estas condições. A dosagem de IL-6 nos esplenócitos estimulados por OVA seria uma maneira de entender melhor os mecanismos observados aqui.

9 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v.61, p.2952-2959, 1993.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv Parasitol**, v.31, p.175-254, 1992.

ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; GUPTA, P. N.; SAHA, S. K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.6, p.231-235, 1999.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, p.1269-1281, 2000.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NORONHA, F. S.; TURCO, S. J.; SOARES, R. P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, p.e1543, 2012.

BACELLAR, O.; FARIA, D.; NASCIMENTO, M.; CARDOSO, T. M.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O.; SCOTT, P.; CARVALHO, E. M. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.200, p.75-78, 2009.

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

BARI, A. U. ; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists** 18, 42-48. 2008.

BARRAL, A.; PETERSEN, E. A.; SACKS, D. L.; NEVA, F. A. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **Am J Trop Med Hyg**, v.32, p.277-285, 1983.

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A. K.; SEEGMULLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A. D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J. A.; ROCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nat Immunol**, v.2, p.1054-1060, 2001.

BOYLE, J.; EASTMAN, D.; MILLAR, C.; CAMUGLIA, S.; COX, J.; PEARSE, M.; GOOD, J.; DRANE, D. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. **Vaccine**, v.25, p.2541-2544, 2007.

BRACHELENTE, C.; MULLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v.42, p.166-175, 2005.

CHENIK, M.; LAKHAL, S.; BEN, K. N.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania* major parasites. **Parasitology**, v.132, p.493-509, 2006.

CHU, N.; THOMAS, B. N.; PATEL, S. R.; BUXBAUM, L. U. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. **J Immunol**, v.185, p.6939-6946, 2010.

COELHO, V. T.; OLIVEIRA, J. S.; VALADARES, D. G.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; SOTO, M.; SANTORO, M. M.; TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, p.e1430, 2012.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v.33, p.492-503, 2010.

COSKUN, U.; SIMONS, K. Cell membranes: the lipid perspective. **Structure**, v.19, p.1543-1548, 2011.

DEAK, E.; JAYAKUMAR, A.; CHO, K. W.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; DONDJU, B.; LAMBRIS, J. D.; MAHON-PRATT, D. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **Eur J Immunol**, v.40, p.1355-1368, 2010b.

DEAK, E.; JAYAKUMAR, A.; CHO, K. W.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; DONDJU, B.; LAMBRIS, J. D.; MAHON-PRATT, D. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **Eur J Immunol**, v.40, p.1355-1368, 2010.

EISENBARTH, S. C.; COLEGIO, O. R.; O'CONNOR, W.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v.453, p.1122-1126, 2008.

EMEA, T. E. M. A. O. M. F. H. U. **GUIDELINE ON ADJUVANTS IN VACCINES FOR HUMAN USE**. 1-18. 2005.

ENGWERDA, C. R.; MURPHY, M. L.; COTTERELL, S. E.; SMELT, S. C.; KAYE, P. M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur J Immunol**, v.28, p.669-680, 1998.

FACHADO, A.; RODRIGUEZ, A.; ANGEL, S. O.; PINTO, D. C.; VILA, I.; ACOSTA, A.; AMENDOEIRA, R. R.; LANNES-VIEIRA, J. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, v.21, p.1327-1335, 2003.

FERRER, L. J. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. **Adv Vet Dermatol, Blackwell Science Oxford** 4, 92-99. 2013.

GAVIN, A. L.; HOEBE, K.; DUONG, B.; OTA, T.; MARTIN, C.; BEUTLER, B.; NEMAZEE, D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. **Science**, v.314, p.1936-1938, 2006.

GHOSH SK, R. C. R. Synthetic adjuvants for vaccine formulations: phytol derivatives. **Expert Opin Drug Deliv**, [Epub ahead of print]. 8-1-2013.

GONZALO, R. M.; RODRIGUEZ, J. R.; RODRIGUEZ, D.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. **Microbes Infect**, v.3, p.701-711, 2001.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **Int J Parasitol**, v.35, p.1169-1180, 2005.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v.11, p.293-306, 1993.

HALPERIN, S. A.; DOBSON, S.; MCNEIL, S.; LANGLEY, J. M.; SMITH, B.; CALLSANI, R.; LEVITT, D.; NEST, G. V.; GENNEVOIS, D.; EIDEN, J. J. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. **Vaccine**, v.24, p.20-26, 2006.

ISAKSON, P. C.; PURE, E.; VITETTA, E. S.; KRAMMER, P. H. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. **J Exp Med**, v.155, p.734-748, 1982.

JENNINGS, R.; SIMMS, J. R.; HEATH, A. W. Adjuvants and delivery systems for viral vaccines--mechanisms and potential. **Dev Biol Stand**, v.92, p.19-28, 1998.

JENNINGS, V. M. Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. **ILAR J**, v.37, p.119-125, 1995.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. **J Immunol**, v.153, p.4948-4958, 1994.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence**, v.1, p.423-427, 2010.

KUMARI, S.; MISRA, P.; TANDON, R.; SAMANT, M.; SUNDAR, S.; DUBE, A. *Leishmania donovani*: immunostimulatory cellular responses of membrane and soluble protein fractions of splenic amastigotes in cured patient and hamsters. **PLoS One**, v.7, p.e30746, 2012.

LAI, R. P.; SEAMAN, M. S.; TONKS, P.; WEGMANN, F.; SEILLY, D. J.; FROST, S. D.; LABRANCHE, C. C.; MONTEFIORI, D. C.; DEY, A. K.; SRIVASTAVA, I. K.; SATTENTAU, Q.; BARNETT, S. W.; HEENEY, J. L. Mixed adjuvant formulations

reveal a new combination that elicit antibody response comparable to Freund's adjuvants. **PLoS One**, v.7, p.e35083, 2012.

MALLAPRAGADA, S. K.; NARASIMHAN, B. Immunomodulatory biomaterials. **Int J Pharm**, v.364, p.265-271, 2008.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat Rev Immunol**, v.9, p.287-293, 2009.

MAZLOOMI, E.; JAZANI, N. H.; SHAHABI, S. A novel adjuvant, mixture of alum and the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol, elicits both humoral and cellular immune responses for heat-killed *Salmonella typhimurium* vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2640-2646, 2012.

PAAPE, D.; BARRIOS-LLERENA, M. E.; LE, B. T.; MACKAY, L.; AEBISCHER, T. Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol**, v.169, p.108-114, 2010.

PATERAKI, E.; PORTOCALA, R.; LABROUSSE, H.; GUESDON, J. L. Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.42, p.496-500, 1983.

PETROVSKY, N. ; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* 82, 488-496. 2008. (GENERIC)
Ref Type: Generic

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**, v.30, p.23-32, 2009.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v.26, p.341-349, 2010.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v.2, p.845-858, 2002.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol**, v.3, p.1041-1047, 2002.

SHAPIRA, M.; MCEWEN, J. G.; JAFFE, C. L. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. **EMBO J**, v.7, p.2895-2901, 1988.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian J Exp Biol**, v.47, p.412-423, 2009.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v.236, p.944-947, 1987.

SU, S. B.; SILVER, P. B.; GRAJEWSKI, R. S.; AGARWAL, R. K.; TANG, J.; CHAN, C. C.; CASPI, R. R. Essential role of the MyD88 pathway, but nonessential roles of

TLRs 2, 4, and 9, in the adjuvant effect promoting Th1-mediated autoimmunity. **J Immunol**, v.175, p.6303-6310, 2005.

WATERS, R. V.; TERRELL, T. G.; JONES, G. H. Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. **Infect Immun**, v.51, p.816-825, 1986.

ZHENG, L.; TKIND, R.; DECUYPERE, S.; VON FREYEND, S. J.; COOMBS, G. H.; WATSON, D. G. Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.24, p.2074-2082, 2010.