

THAÍS VIEIRA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DE IMUNOGENICIDADE DE CAMUNDONGOS
BALB/c APÓS INOCULAÇÃO COM PROTEÍNA LIGANTE DE
HEPARINA DE *Leishmania chagasi***

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
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C331a
2014
Carvalho, Thaís Vieira de, 1987-
Avaliação de imunogenicidade de camundongos BALB/c
após inoculação com proteína ligante de heparina de *Leishmania*
chagasi / Thaís Vieira de Carvalho. – Viçosa, MG, 2014.
xiii, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.46-60.

1. Leishmaniose visceral. 2. Heparina. 3. Lectinas.
4. Imunologia. 5. Rato com animal de laboratório.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

THAÍS VIEIRA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DE IMUNOGENICIDADE DE CAMUNDONGOS
BALB/c APÓS INOCULAÇÃO COM PROTEÍNA LIGANTE DE
HEPARINA DE *Leishmania chagasi***

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: 05 de Setembro de 2014.



Silvia Almeida Cardoso



Sérgio Oliveira de Paula



Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”*

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me segurado em suas mãos durante todos os dias dessa jornada...

Aos meus amados pais Helena e Cícero por todo incentivo, suporte, apoio e amor incondicional! Ter vocês como pais foi um enorme presente de Deus!

Aos meus queridos irmãos Elaine, Alessandro, Elizabete e Patrícia. Aos meus sobrinhos e cunhados!

Ao meu noivo Leonardo por todo o suporte e companheirismo, pelo amor e carinho que fizeram com que tudo fosse mais leve!

Ao Eduardo pela orientação tão produtiva e por estar sempre disponível. Agradeço imensamente pela sua participação no meu processo de amadurecimento científico! Serei sempre grata!

Ao Leandro por ser sempre solícito e pela enorme contribuição no desenvolvimento desse trabalho!

À Sílvia pelo apoio sempre!

Aos professores Sérgio e a Juliana Fietto por sempre deixarem as portas dos seus laboratórios abertas! Muito Obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de concluir esse trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido.

Aos professores que aceitaram o convite para participar da banca.

Aos amigos do laboratório que me ajudaram de tantas formas na realização dos experimentos e pelos momentos agradáveis que passamos (Ju, Mi, Carine, Luan, Robertinho, Eliziária, João, Jorge, Mari, Livinha, Vinícius, Vinição, Jerusa, Wendel, Daniel, David, Graci, Cris e Cynthia).

Ao Yaro, ao Mateus e ao Rafael do LIMA pelo auxílio.

À secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Beth.

Às minhas companheiras de trabalho Thaís Viana, Priscila e Bianca por toda a ajuda, carinho e pela convivência tão agradável durante esses dois anos!

A Wiviane pela amizade sincera e o apoio de sempre!

Às amigas de Viçosa e Ouro Preto pelo apoio e por estar comigo durante toda essa jornada!

Índice

Lista de figuras	vii
Lista de siglas.....	viii
Resumo	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	3
2.1 Leishmanioses: definição e taxonomia	3
2.2 Transmissão e Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> sp	5
2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses	8
2.4 Epidemiologia e urbanização da LV.....	10
2.5 Resposta imunológica na leishmaniose.....	12
2.6 Tratamentos e vacinas para a LV	15
2.7 Lectinas e a sua utilização como imunógeno.....	18
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. Material e métodos.....	22
4.1 Animal experimental	22
4.2 Obtenção dos parasitos	22
4.3 Cultura dos parasitos e obtenção de extrato proteico solúvel de <i>L. chagasi</i> ..	22
4.4 Obtenção de antígeno particulado de <i>L. chagasi</i> (AgLc)	23
4.5 Purificação de PLHLc do extrato parasitário.....	23
4.6 Dosagem de PLHLc e AgLc	24
4.7 Análise eletroforética de PLHLc	24
4.8 Experimentos de imunização.....	24
4.9 Obtenção de soro para detecção dos isotipos IgG1/IgG2a	25

4.10 Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas, óxido nítrico e ensaio de linfoproliferação	25
4.11 Ensaio de linfoproliferação	26
4.12 Dosagens de IFN- γ , IL-4 e IL-10	26
4.13 Dosagem de óxido nítrico	27
4.14 Dosagem de IgG1 e IgG2a	27
4.15 Análise estatística	28
5. Resultados	29
5.1 Análise da purificação de PLHLc	29
5.2 Avaliação da proliferação celular de esplenócitos murinos estimulados com PLHLc ou AgLc após a imunização dos animais com PLHLc	30
5.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) produzidas por esplenócitos estimulados com AgLc e PLHLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc	31
5.3.1 Produção de IFN- γ	31
5.3.2 Produção de IL-4	32
5.3.3 Produção de IL-10.....	33
5.4 Avaliação da produção de NO produzidas por esplenócitos estimulados com AgLc e PLHLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc	34
5.4 Dosagem dos isotipos IgG2a e IgG1 anti-PLHLc	35
5.4.1 IgG2a.....	36
5.4.2 IgG1.....	37
5.4.3 Razão IgG1/IgG2a	38
6. Discussão	39
7. Conclusões.....	44
8. Perspectivas de estudo	45
9. Referências bibliográficas	46

Lista de figuras

Figura 1: Morfologia de <i>Leishmania</i> sp.....	4
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	7
Figura 3: Formas clínicas da leishmaniose.....	9
Figura 4: Experimento de imunização.....	25
Figura 5: Avaliação da purificação de PLHLc de extrato total de formas promastigotas de <i>L. chagasi</i>.....	30
Figura 6: Análise da proliferação celular <i>in vitro</i> de células esplênicas murinas após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	31
Figura 7: Produção de IFN-γ por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	32
Figura 8: Produção de IL-4 por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	33
Figura 9: Produção de IL-10 por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	34
Figura 10: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	35
Figura 11: Cinética da produção de IgG2a anti-PLHLc por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	37
Figura 12: Cinética da produção de IgG1 anti-PLHLc por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF.....	38
Figura 13: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos submetidos a diferentes protocolos de imunização conforme descrito na metodologia.....	39

Lista de siglas

ABTS- Ácido 2,2 -bis -azino (3 -etilbenzil -thiazol -6 -sulfônico)

AgLc- Antígeno particulado de *Leishmania chagasi*

AIF- Adjuvante Incompleto de Freud

BCA- Ácido Bicinconínico

CFMV- Conselho Federal de Medicina Veterinária

ConA- Concanavalina A

DC- Células Dendríticas

DMSO- Dimetilsulfóxido

FML- Ligante de Fucose e Manose

IFN- γ - Interferon Gama

IL-2- Interleucina-2

IL-4- Interleucina-4

IL-10- Interleucina-10

IL-12- Interleucina-12

iNOS- NO Sintetase Induzível

kDNA- DNA mitocondrial

LC- Leishmaniose Cutânea

LCD- Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL- Leishmaniose Cutânea Localizada

LDPK- Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar

LMC- Leishmaniose Mucocutânea

LPG- Lipofosfoglicano

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

LVH- Leishmaniose Visceral Humana

MAC- Complexo de Ataque a Membrana

MPL-Monofosforil Lipídeo A

MTT: 3-[4,5 - dimethylthiazol -2] -2,5 - diphenyltetrazolium bromide

Nedd- dicloreto N-naftil etilenodiamina

OPD- Orto-fenil-diamina

PBS- Salina Tamponada com Fosfato

PLH- Proteínas Ligantes de Heparina

PLHLc – Proteínas Ligantes de Heparina de *L. chagasi*

SFM- Sistema Fagocítico Mononuclear

TNF- Fator de Necrose Tumoral

Resumo

CARVALHO, Thaís Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2014. **Avaliação de imunogenicidade de camundongos BALB/c após inoculação com proteína ligante de heparina de *Leishmania chagasi***. Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por parasitos intracelulares da espécie *L. infantum/chagasi*. Esses protozoários possuem um forte tropismo por órgãos viscerais, nos quais se proliferam e causam graves lesões podendo resultar em óbito do paciente se não for tratada. Moléculas presentes no parasito consideradas como fatores de virulência vêm sendo intensamente pesquisadas. Entre elas estão as proteínas ligantes de heparina (PLH), que são glicoproteínas relacionadas em diversos trabalhos da literatura com o processo de adesão entre células. Nesse trabalho utilizamos a PLH de *L. chagasi* (PLHLc) em experimentos de imunização de camundongos BALB/c para avaliar sua imunogenicidade. Foram avaliadas a proliferação celular, produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10), de óxido nítrico (NO) e dos isotipos de anticorpos IgG1/IgG2a após a imunização com PLHLc associada ou não com Adjuvante Incompleto de Freud (AIF). Os animais foram imunizados por via intraperitoneal, sendo submetidos a duas doses de reforço utilizando o mesmo protocolo da primeira imunização. Antes de cada imunização o sangue foi coletado para a obtenção de soro e posterior dosagem de IgG1 e IgG2a. Duas semanas após o último reforço, os camundongos foram eutanasiados e o baço foi coletado para o ensaio de linfoproliferação e análise da produção de citocinas e NO por ELISA e pelo método de Griess, respectivamente. Nossos resultados mostraram que esplenócitos do grupo tratado com PLHLc, após estímulo *in vitro* com antígeno particulado de *L. chagasi* (AgLc) ou com PLHLc, apresentaram aumento de linfoproliferação e de produção de IFN- γ , IgG2a, NO e IL-10 em relação aos do grupo não tratado, porém com níveis mais altos de produção de IFN- γ e mais baixos de IgG1, quando comparado com os do grupo vacinado com PLHLc + AIF. Já o grupo PLHLc + AIF, sob as mesmas condições de estímulo *in vitro*, apresentou um aumento de linfoproliferação e dos níveis de IFN- γ , NO, IL-4, IgG2a, IgG1 e IL-10 no baço quando comparados com os resultados do grupo não vacinado. Como podemos observar, foram obtidos dois perfis distintos de resposta imune durante as imunizações, sendo um perfil Th1 observado no grupo imunizado somente com a PLHLc e um perfil misto Th1/Th2 quando a proteína foi utilizada

associada ao adjuvante nos experimentos. Os dois perfis obtidos são relatados na literatura com a proteção contra a LV. Esses resultados mostram que a PLHLc é um forte candidato a antígeno vacinal para o uso em formulações vacinais, e que experimentos adicionais são necessários para avaliar a capacidade de proteção contra desafios por *L. chagasi* para o uso da PLHLc no controle da LV.

Abstract

CARVALHO, Thaís Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2014. **Evaluation of immunogenicity of BALB/c mice after inoculation with heparin-binding protein from *Leishmania chagasi* (HBPLc)**. Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by the intracellular protozoan *Leishmania infantum/chagasi*. This protozoa exhibit a strong tendency to invade the viscera causing severe lesions, which may result in patient death if not treated. Molecules in the parasite, considered as virulence factors, have been intensively searched. Among them are heparin-binding proteins (HBP), glycoproteins that are related in many works of the literature with the process of adhesion between cells. In this work, we used *L. chagasi* HBP (HBPLc) in immunization experiments using BALB/c mice to evaluate immunogenicity of the protein. Thus, we evaluate the cell proliferation and cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-10), NO and antibody isotypes IgG1 and IgG2a production following immunization with *L. chagasi* HBP (HBPLc), associated or not with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). The mice were intraperitoneally immunized and submitted two times to booster doses using the same protocol of the first immunization. Before each immunization, blood was collected to obtain serum for the dosage of the antibody isotypes IgG1 and IgG2a. Two weeks after the second booster, the animals were euthanized and the spleen was collected for lymphoproliferation assay, analysis of cytokines and NO production by ELISA and Griess method, respectively. Our results showed that spleen cells from HBPLc vaccinated group after *in vitro* stimulus with crude extract of *L. chagasi* (AgLc) or with HBPLc showed an increase in cell proliferation and IFN- γ , IgG2a, NO and IL-10 production if compared with spleen cells from non-vaccinated group, but with higher levels of IFN- γ and lower levels of IgG1 if compared with spleen cells from HBPLc + IFA vaccinated group submitted to the same stimulus. Otherwise, HBPLc + IFA vaccinated group, under the same *in vitro* stimuli conditions above, showed higher levels of lymphoproliferation and IFN- γ , NO, IL-4, IgG2a, IgG1 and IL-10 in the spleen if compared with the results obtained from non-vaccinated group. As can be seen, two distinct profiles of immune response after immunizations were obtained, being a Th1 profile observed in the group immunized only with HBPLc and Th1/Th2 mixed profile when the protein was associated with IFA. These results show that

HBPLc is a candidate antigen for use in vaccine formulations and additional experiments to evaluating the performance of protection against *L. chagasi* challenge should be conducted to evaluate the use of HBPLc in the control of LV.

1. Introdução

As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas que afetam uma grande parte da população de países em desenvolvimento, causando grandes taxas de mortalidade e morbidade. Possui como agente etiológico o protozoário que pertence ao gênero *Leishmania*, parasito que, dependendo da sua espécie, pode causar desde lesões cutâneas a lesões em órgãos viscerais, sendo esse último quadro denominado Leishmaniose Visceral (LV). A LV é a forma mais grave da doença, que acomete órgãos vitais como fígado e baço, se não tratada, pode levar o paciente ao óbito. Sua transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos que, ao realizarem o repasto sanguíneo, inoculam o parasito em hospedeiros mamíferos como o homem e o cão (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O grande número de pessoas que são anualmente afetadas por essa patologia, aproximadamente 58 mil casos/ano, fora os casos que não são relatados oficialmente. Essa parasitose ocorre em aproximadamente 12 países no Novo Mundo, sendo que 90% dos casos são relatados no Brasil, com uma maior predominância nas regiões menos favorecidas economicamente (BELO *et al.*, 2013).

Embora exista muita informação sobre a biologia do parasito, ainda não existe um medicamento que seja altamente eficaz para o tratamento dessa doença ou vacinas licenciadas para uso em humanos. A vacinação seria uma importante forma de controle dessa doença, já que os fármacos que comumente são utilizados no tratamento da LV não são eficazes devido à resistência desenvolvida pelos parasitos aos mesmos. Além disso, a toxicidade gerada pela sua administração leva muitas vezes à intolerância e à interrupção do tratamento por grande parte dos pacientes (MUTISO *et al.*, 2013).

Moléculas presentes no parasito, consideradas como fatores de virulência, vêm sendo intensamente pesquisadas. Entre elas estão as lectinas ligantes de heparina, que são glicoproteínas relacionadas em diversos trabalhos da literatura com o processo de adesão entre células (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O bloqueio da atividade dessas moléculas objetivando a diminuição da infecciosidade do parasito ou, mais especificamente, sua utilização como estimuladoras do sistema imunológico, induzindo uma resposta protetora contra infecções subsequentes, são alvos de grande valor para o controle da forma visceral da leishmaniose em mamíferos, sejam eles humanos ou outros animais como o cão, um importante reservatório da doença, principalmente em áreas urbanas.

A avaliação da imunogenicidade induzida por lectinas de *L. chagasi* irá fornecer informações sobre essas moléculas que podem ser usadas para uma possível formulação vacinal contra a LV, visto que o balanço da produção de citocinas e de óxido nítrico induzido pela vacina pode levar à resistência do hospedeiro frente ao desafio com as formas infectantes do parasito.

2. Revisão da literatura

2.1 Leishmanioses: definição e taxonomia

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por patógenos pertencentes ao reino Protista, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Protozoários da ordem Kinetoplastida caracterizam-se por terem uma mitocôndria única, denominada cinetoplasto, que é rica em DNA mitocondrial (kDNA). Os parasitos que pertencem ao gênero *Leishmania* são digenéticos e apresentam duas formas evolutivas durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados e também podem ser encontradas em culturas axênicas, onde podem ser mantidas em laboratório e a forma amastigota, que pode ser encontrada parasitando as células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados (KEDZIERSKI, 2011).

As formas evolutivas do parasito se diferenciam tanto em relação à sua morfologia quanto a sua motilidade. As formas promastigotas, estágio extracelular do protozoário, são alongadas e possuem flagelo livre, e medem em torno de 14 a 20 μm . Elas são as responsáveis pela infecção dos agentes vetores e do hospedeiro vertebrado (Figura 1-A). As formas amastigotas são intracelulares, ovoides, possuem um flagelo interno e medem, em média, entre 3 e 5 μm , o que varia de acordo com o complexo a que pertencem (Figura 1-B). Essa forma do parasito é a responsável pela disseminação e manutenção da patologia no hospedeiro mamífero. Esses protozoários são inoculados em mamíferos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos, que atuam como hospedeiros invertebrados desses parasitos (DOSTALOVA; VOLF, 2012).

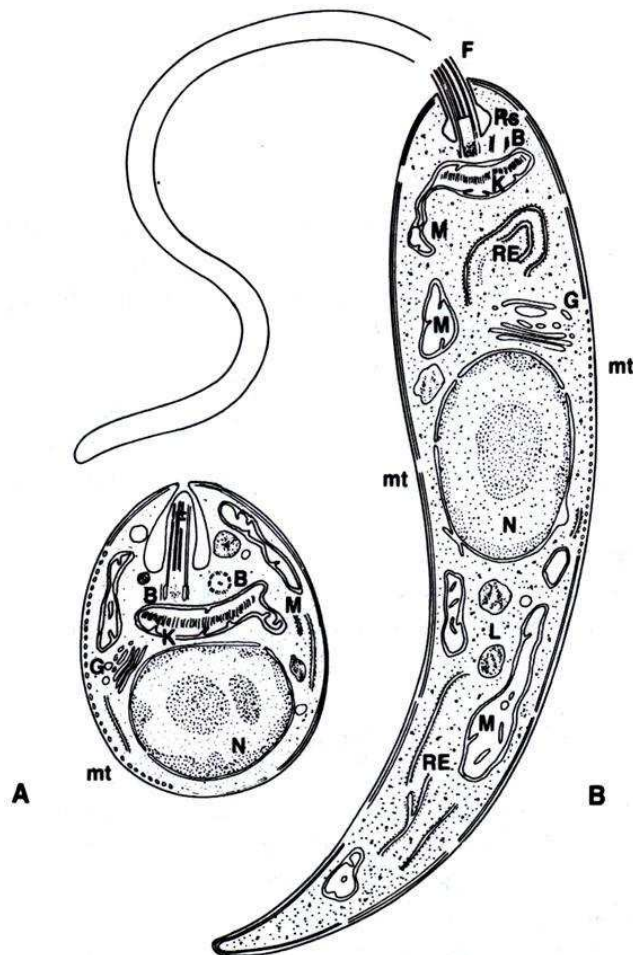


Figura 1: Morfologia de *Leishmania* sp - Figura esquemática mostrando o núcleo (N), cinetoplasto (K), flagelo (F) e mitocôndria (mt) das formas amastigotas (A) e promastigotas (B). Disponível em: Rey, L. – Bases da Parasitologia. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

Lainson e Shaw, em 1972, classificaram esses protozoários que infectam o homem em complexos agrupados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Esses subgêneros agrupam os parasitos de acordo com as suas características biológicas, como tropismo celular, tamanho e local de colonização no intestino do inseto vetor. O subgênero *Viannia* compreende os parasitos que pertencem ao complexo “*Leishmania braziliensis*” e incluem espécies como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) peruviana*. Esses parasitos proliferam no intestino anterior, médio e posterior do flebotomíneo. As formas amastigotas são pequenas e não apresentam tropismo visceral, sendo responsáveis pelas formas tegumentares da doença (LAINSON; SHAW, 1972; LAINSON; SHAW, 1988; RIOUX *et al.*, 1990).

Os protozoários que pertencem ao subgênero *Leishmania* estão divididos em dois complexos denominados “*Leishmania mexicana*” e “*Leishmania donovani*”, que se diferenciam em relação ao tamanho da forma intracelular do parasito e em relação às lesões que causam em seus hospedeiros vertebrados, mas possuem o mesmo local de desenvolvimento no intestino do inseto vetor: intestino anterior e médio. Os parasitos

que pertencem ao complexo *Leishmania mexicana* são os que apresentam formas amastigotas com o maior tamanho, e as lesões causadas no homem por esses protozoários se restringem à pele, sendo consideradas benignas, já que não causam as lesões que afetam as mucosas ou as vísceras. As espécies que pertencem a esse complexo são *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) pifanoi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. No complexo *Leishmania donovani* estão presentes os parasitos que possuem um forte tropismo a invadir e se proliferar nas vísceras, e suas formas amastigotas são as menores quando comparadas com as dos demais complexos. As espécies que fazem parte desse complexo são as responsáveis pela forma mais grave e fatal da doença, a LV, e são denominadas *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. As duas primeiras espécies são responsáveis pela LV no Velho Mundo e a última é responsável por essa forma clínica no Novo Mundo (CUPOLILLO *et al.*, 1994; LAINSON; SHAW, 1988).

2.2 Transmissão e Ciclo Biológico de *Leishmania* sp

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos para os hospedeiros mamíferos por meio da picada de fêmeas hematófagas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo. Esses insetos são conhecidos popularmente no Brasil como mosquito palha, cangalha, tatuíra, asa dura ou birigui. O *Lu. longipalpis* é o principal vetor no Novo Mundo, mas a transmissão também pode ocorrer por *Lu. Cruzi* e *Lu. Evansi*. Além disso, outras formas de transmissão dessa doença já foram relatadas, como por transfusão sanguínea, agulhas contaminadas e transmissão congênita (ZINCHUK; NADRAGA, 2010; BELO *et al.*, 2013). Essa patologia é mantida por uma tríade de interações que envolvem os parasitos, os flebotomíneos e os hospedeiros vertebrados, reservatórios desses parasitos. Entre esses reservatórios podem-se citar mamíferos silvestres e o cão, sendo esse último o principal reservatório doméstico da *L. chagasi*, resultando na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (NTAS-TORRES, 2009). O ciclo da *Leishmania* sp é relativamente simples e envolve um estágio no hospedeiro invertebrado e outro em hospedeiro mamífero (Figura 2). As fêmeas de flebotomíneos adquirem o protozoário quando realizam o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, dando início ao ciclo de vida do parasito no inseto vetor. Juntamente com o sangue adquirido durante a hematofagia, os insetos ingerem macrófagos repletos de formas amastigotas do

patógeno que são liberadas no seu intestino após a ruptura desses fagócitos. Nesse ambiente as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, mudança essa influenciada por alterações nas condições do ambiente encontrado no interior do intestino do inseto em relação às do hospedeiro vertebrado, como o aumento do pH e diminuição da temperatura. As procíclicas multiplicam rapidamente e se diferenciam em metacíclicas através de um processo denominado metaciclogênese, sendo as formas responsáveis pela infecciosidade do parasito. As formas promastigotas metacíclicas migram para as glândulas salivares do inseto que ao tentar realizar a hematofagia acaba inoculando juntamente com a sua saliva essas formas do parasito (ESCH; PETERSEN, 2013). Ao serem inoculadas nos vasos superficiais da derme do hospedeiro vertebrado, essas formas evolutivas do parasito são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e neutrófilos que são recrutados para o sítio de infecção. No interior dos macrófagos as metacíclicas se transformam em amastigotas, a única forma encontrada em lesões de seres humanos e de outros vertebrados, que se multiplicam até causarem a lise dessas células. Essas amastigotas podem então ser fagocitadas por novos macrófagos ou podem ser ingeridas por outro inseto vetor durante o repasto sanguíneo, mantendo, assim, o ciclo da doença (DOSTALOVA; VOLF, 2012; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012).

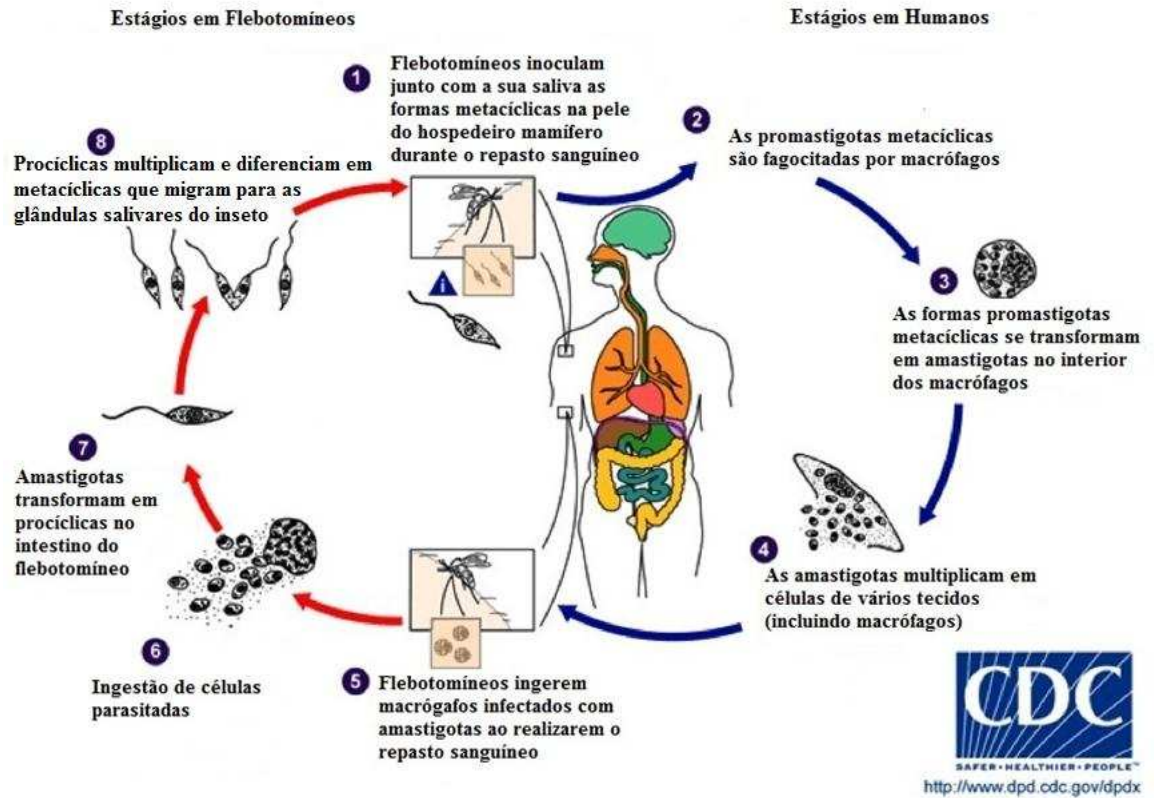


Figura 2: Ciclo de Vida de *Leishmania* sp. Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/GL/Leishmaniasis/LeishmaniaLifeCycle.gif>.

Um aspecto muito importante nessa relação entre o parasito e os seus hospedeiros envolve a saliva do inseto vetor, que exerce um papel no estabelecimento do parasito no hospedeiro vertebrado. Um trabalho clássico realizado por *Titus e colaboradores* em 1988 mostrou que na presença da saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* a infecção por *L. major* é exacerbada. Isso ocorre devido à presença de moléculas que facilitam o influxo de sangue para o local do repasto sanguíneo e acabam favorecendo a infecção (TITUS; RIBEIRO, 1988). Dentre essas moléculas estão proteínas salivares que possuem ação vasodilatadora e anticoagulante. Uma dessas proteínas já bastante estudada e que possui ação vasodilatadora e imunomoduladora é a maxadilina. Essa molécula atua, por exemplo, inibindo a ativação de células T e a produção de óxido nítrico (NO), além de regular positivamente a produção de citocinas associadas com a resposta Th2, que é considerada não protetora para as leishmanioses (GOMES; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de acordo com a espécie do parasito e a susceptibilidade genética do hospedeiro mamífero. Essa patologia é caracterizada por síndromes que afetam a pele ou as vísceras, sendo denominadas Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e LV, respectivamente (Figura 3).

A LC é causada por várias espécies de parasitos, dentre elas *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* na América do Sul e Central, e *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* no Velho Mundo. Essas espécies, na maioria das vezes, causam, em humanos, lesões localizadas que podem curar espontaneamente em alguns meses. Dentre essas espécies, a *L. major* apresenta uma progressão e resolução mais rápida da doença, já a *L. aethiopica* possui uma progressão mais lenta assim como a resolução da patologia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LMC e LCD fazem parte dos fenótipos da LC. As lesões que caracterizam a LMC afetam as mucosas das vias aerodigestivas superiores, dificultando a fala e a respiração. Essa forma da doença causa, além de problemas físicos, enormes consequências psíquicas, uma vez que as pessoas acometidas são vítimas de preconceito e até mesmo isolamento devido ao aspecto desfigurante decorrente da doença, recebendo, inclusive, apelidos como nariz de anta ou de tapir. A forma difusa dessa patologia acomete hospedeiros anérgicos, que não conseguem gerar uma resposta imunológica celular eficiente para controlar a proliferação dos parasitos. As lesões encontradas nessa forma são nodulares e cobrem grandes extensões do corpo do indivíduo afetado (GIUDICE *et al.*, 2012).

A LV, a forma mais grave dentre as formas clínicas das leishmanioses, é causada por parasitos que pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, sendo as espécies *L. infantum* e *L. donovani* responsáveis pela doença no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Essa parasitose foi descrita pela primeira vez por William Leishman e Charles Donovan, que encontraram esses parasitos no baço de pacientes portadores de Malária, e nomearam, então, essa patologia como LV. Essa descoberta aconteceu separadamente, mas simultaneamente em 1903 (LEISHMAN, 1994). Esses protozoários possuem um forte tropismo para invadir as vísceras, onde se localizam de preferência no baço e fígado, além da medula óssea e órgãos linfoides. Os sintomas dessa patologia incluem febre alta de longa duração, hepatoesplenomegalia, supressão da medula óssea, linfadenopatia, hipergamaglobulemia, anemia, leucopenia e perda de peso. Os pacientes

com a forma ativa da doença exibem imunossupressão e podem sucumbir a infecções secundárias. Outro fator preocupante em relação à LV é a presença dessa doença em pacientes infectados com o vírus da AIDS. A taxa de mortalidade desses pacientes é mais elevada em relação à daqueles não infectados pelo vírus, devido à supressão do sistema imunológico presente na AIDS, que torna o paciente menos capaz de controlar a disseminação do parasito, além da própria toxicidade dos fármacos utilizados durante o tratamento (COTA *et al.*, 2013).

Alguns pacientes que recebem tratamento para LV e permanecem assintomáticos durante meses podem apresentar proliferação dos parasitos na pele – Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (LDPK). Essa forma clínica é encontrada principalmente na Índia e no Sudão. Os pacientes que são afetados pela LDPK se tornam um reservatório de parasitos para novas infecções devido a alta carga parasitária na pele (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, o surgimento da LDPK em pacientes portadores do HIV tem sido relatado na literatura (SHAH *et al.*, 2010).

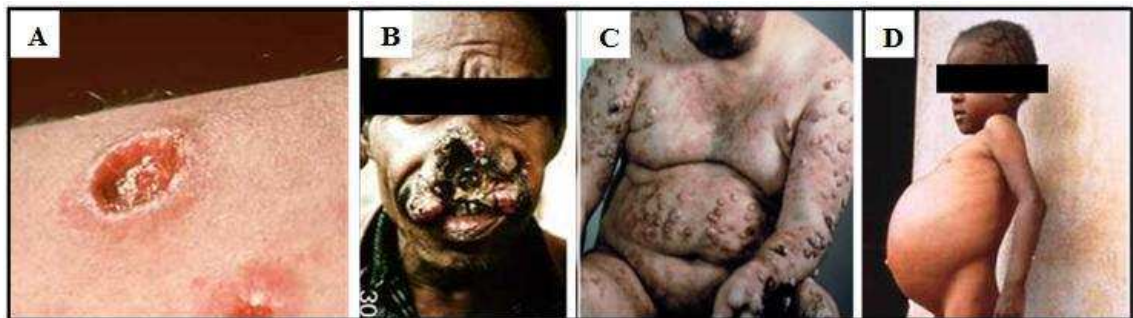


Figura 3: Formas clínicas da leishmaniose. (A) LC, (B) LMC, (C) LCD, (D) LV. Adaptado de <http://olhovirtual.wordpress.com/2010/10/08/leishmaniose-visceral/>.

Vários estudos foram desenvolvidos para explicar as diferenças de localização das espécies que causam as diferentes formas clínicas das leishmanioses. Como algumas espécies migram e proliferam nos órgãos viscerais, como *L. donovani*, e outras, como *L. major*, se restringem à pele, é uma questão que vem sendo bastante questionada, e alguns grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para responder a essa questão (MCCALL *et al.*, 2013a). Trabalhos presentes na literatura demonstram que, quando parasitos das espécies *L. major* e *L. donovani* são inoculados pela via intravenosa, via utilizada em modelos animais para o estudo da LV, apresentam diferentes características de acometimento do fígado e do baço. A espécie cutânea desenvolve uma infecção branda e baixa carga parasitária, já a forma responsável pela LV desenvolve uma infecção grave e alto parasitismo desses órgãos. Esse tropismo

pode ser explicado pela adaptação das formas viscerotrópicas a temperaturas mais altas, o que permite que essa espécie parasite e prolifere em órgãos viscerais, nos quais as temperaturas são mais altas quando comparadas com as da pele (CALLAHAN *et al.*, 1996; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010). Estudos mostraram que a transfecção de alguns genes de *L. donovani* para *L. major* aumenta a sobrevivência a temperaturas mais altas e, conseqüentemente, a visceralização por essa espécie (ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001). Até mesmo a saliva dos flebotomíneos pode influenciar no comportamento dessas espécies cutâneas e viscerais. A saliva dos insetos que habitam regiões endêmicas para LC possuem uma menor quantidade de proteínas que causam a vasodilatação dos vasos periféricos, com isso os parasitos ficam mais limitados à derme do hospedeiro. Já em regiões onde há uma predominância de LV, a quantidade dessas proteínas encontradas na saliva dos flebotomíneos são maiores e, ao serem inoculadas durante o repasto sanguíneo desses insetos, resultam em dilatação dos vasos presentes na derme e maior distribuição dos parasitos para os órgãos viscerais (WARBURG *et al.*, 1994).

2.4 Epidemiologia e urbanização da LV

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de adquirir LV e aproximadamente 58 mil casos dessa parasitose são oficialmente relatados a cada ano. Esses dados, porém, podem ser bem maiores, já que somente dois terços dos países endêmicos atualmente relatam a incidência dessa patologia. A maioria dos casos de LV ocorre em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. Os principais fatores responsáveis pela alta incidência dessa doença são: o nível socioeconômico da população, falta de acessibilidade ao tratamento e a medidas de prevenção, migração de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e transmissão por vetores devida a condições ambientais favoráveis encontradas nesses locais para a proliferação dos insetos (ALVAR *et al.*, 2012; READY, 2014).

O Brasil é o país da América Latina mais afetado por essa patologia, sendo que, dos 12 países que compõem essa região do continente americano, 90% dos casos de LV são reportados em nosso país. Inicialmente a LV era considerada uma doença endêmica rural restrita principalmente à região nordeste do Brasil, porém as modificações ambientais causadas pelo homem nas últimas décadas como o desflorestamento, crescimento urbano desordenado e a presença do agente vetor que facilmente se adaptou

às áreas peridomésticas, fizeram com que essa doença se tornasse cada vez mais urbana, o que pode ser confirmado pelos altos índices de LV em várias cidades brasileiras. Outro aspecto epidemiológico importante dessa parasitose, e que está diretamente relacionado com a urbanização da doença, consiste no fato de que as fêmeas dos flebotomíneos se alimentam tanto de sangue de animais silvestres como de mamíferos que habitam regiões urbanas, principalmente o cão e o ser humano. Os animais silvestres são picados por insetos peridomiciliares, se tornando um elo importante para a transmissão para os cães e o homem. Os cães são importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV e são considerados a principal fonte de infecção dos flebotomíneos devido à intensa carga parasitária na pele. Além disso, a proximidade do cão doméstico com os humanos facilita a transmissão nas áreas urbanas. Sendo assim, a LV, que era primariamente considerada uma zoonose de caráter rural, tornou-se um crescente problema de saúde pública (BARATA *et al.*, 2013).

Aproximadamente 3 mil casos fatais de LV foram relatados no período de 2001 a 2011 de um total de 12.491.280 mortes ocorridas no Brasil. Estudos epidemiológicos sobre esses casos que resultaram em óbito por LV nesse período de 10 anos mostram que Minas Gerais foi o estado com a maior proporção de casos, superando até mesmo os estados da região nordeste (BARATA *et al.*, 2013; MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

Algumas cidades do estado de Minas Gerais, como Governador Valadares e Montes Claros, representam alguns dos principais focos de transmissão da LV nesse estado. Em Governador Valadares os primeiros casos de LV foram relatados na década de 60, a partir daí se tornando uma área endêmica para essa patologia. Porém, quando foi aplicado, nessa região, um programa de controle da LV, esse município passou a ser considerado como uma área endêmica controlada. A partir da década de 90 essas medidas de controle foram interrompidas, surgindo, então, no ano de 2008, novos casos de LV nessa cidade. Estudos epidemiológicos mostram que no período de 2008 a 2011, 86 casos de LV foram relatados com uma taxa de letalidade de aproximadamente 16%. Dois fatores principais que culminam na transmissão dessa parasitose foram encontrados nessa região: uma alta prevalência de LVC (4.992 cães soro positivos) e várias espécies de flebotomíneos nas áreas peridomiciliares (90% composta por *L. longipalpis*), tornando-se, portanto, um local de reemergência da LV (BARATA *et al.*, 2013).

Montes Claros, localizada na Região Norte do estado de Minas Gerais, é um município considerado endêmico para LV, no qual a presença de casos humanos de LV, uma alta densidade de cães infectados e agentes vetores são encontrados. Durante o

período de 2007 a 2009 foram confirmados 95 casos de LV, sendo que desses casos 6 foram fatais. Várias características ambientais como o clima e a topografia favorecem a proliferação dos hospedeiros invertebrados da *Leishmania*, o que faz dessa cidade um local propício para a ocorrência tanto da LV humana quanto da canina (PRADO *et al.*, 2011).

2.5 Resposta imunológica na leishmaniose

A leishmaniose é uma patologia na qual os agentes etiológicos são parasitos intracelulares obrigatórios. Uma resposta imunológica celular na qual ocorre a ativação de linfócitos Th1 é considerada um padrão protetor, e a resposta humoral, ativação de linfócitos Th2, um padrão de susceptibilidade à doença (MUTISO *et al.*, 2013). No entanto, componentes da resposta imune inata, como células dendríticas (DC), macrófagos e neutrófilos são importantes para o controle da entrada do parasito no hospedeiro e da sua proliferação, quando ativados pela ação de citocinas (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Ao realizar o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos inoculam as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, que são opsonizadas pelas proteínas do complemento. Esses protozoários são então fagocitados pela interação com os receptores CR3 e CR1 dos neutrófilos ou dos macrófagos e são internalizados. A *Leishmania* possui alguns fatores de virulência como a protease gp63 que impedem a anexação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC) do sistema complemento à superfície do parasito (OLIVIER *et al.*, 2012). Após o parasito ser inoculado no hospedeiro vertebrado, a proteína C3b do complemento se liga à superfície do parasito, sendo clivada pela protease gp63, também presente na superfície desse protozoário, formando iC3b (forma inativa de C3b). Essa forma inativa não permite a formação do complexo lítico e ainda interage com o receptor CR3 dos fagócitos, o que culmina na fagocitose do parasito sem que ocorra a ativação das vias microbicidas dos macrófagos. Com isso, a entrada do mesmo pode ocorrer sem a ativação dos fatores microbicidas dos fagócitos (BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

Uma vez no interior dos macrófagos, as formas metacíclicas evitam ser mortas pela atividade microbicida desses fagócitos antes da sua diferenciação em amastigota. Uma das formas de garantir essa passagem silenciosa no hospedeiro é a inibição da biogênese dos fagolisossomos, já que as promastigotas não conseguem sobreviver dentro do ambiente hostil dessas estruturas (GIUDICE *et al.*, 2012; MORADIN;

DESCOTEAUX, 2012). Na literatura alguns trabalhos mostram que, quando as formas promastigotas metacíclicas entram nos macrófagos por meio de cavéolas, ocorre um retardo na fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos. As cavéolas são microdomínios de membrana em forma de balsas que são formadas por esfingolipídeos, colesterol e proteínas como as caveolinas. Quando ocorre a infecção pela *Leishmania*, a expressão de proteínas que compõem as cavéolas, como caveolina 1, aumenta gradativamente e se agrupam em torno do fagossomo, atrasando em média 24-48h a fusão com os lisossomos, o que garante que as promastigotas se transformem em amastigotas, que possuem a capacidade de sobreviver dentro dessas estruturas fundidas (RODRIGUEZ *et al.*, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

As amastigotas são as formas do parasito responsáveis pela manutenção da doença no hospedeiro vertebrado, no qual se multiplicam dentro dos macrófagos. Essas formas possuem a capacidade de sobreviver dentro do ambiente ácido e repleto de hidrolases que estão presentes nos lisossomos dos macrófagos (LEWIS; PETERS, 1977; CHANG; DWYER, 1978). A atividade ótima para o seu metabolismo, respiração e catabolismo de substratos energéticos ocorre justamente sob pH ácido, o oposto da forma promastigota, que necessita de pH neutro para o funcionamento do seu metabolismo (MUKKADA *et al.*, 1985). Além disso, para evitar o contato com os componentes oxidantes produzidos pelos macrófagos, as amastigotas dificultam a geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de diversos mecanismos, entre eles impedindo a montagem do complexo NADPH oxidase o que facilita a sua sobrevivência dentro dos vacúolos parasitóforos (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

A resolução da doença ou a sua severidade estão associadas ao perfil de produção de citocinas do hospedeiro mamífero, o que depende tanto da sua genética como do seu estado nutricional (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Além disso, fatores relacionados com a espécie do parasito e, conforme já citado anteriormente, com a composição da saliva do inseto vetor também exercem uma grande influência no perfil de produção dessas moléculas. A resistência à leishmaniose está relacionada com a ativação de linfócitos Th1, resultando na produção de interleucina-2 (IL-2) e Interferon gama (IFN- γ). A citocina responsável por esse direcionamento é a interleucina-12 (IL-12), que, ao interagir com as células T imaturas (Th0) faz com que essas se diferenciem em células T CD4⁺ efectoras com padrão Th1 (HEINZEL *et al.*, 1989; GOUR *et al.*, 2012). A morte dos parasitos ocorre por meio da ativação das vias microbicidas dos macrófagos, que leva à produção de óxido nítrico em resposta à ativação por IFN- γ e

linfotóxicas produzidos por células T CD4+ e pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF) produzido pelos próprios macrófagos. Esses fagócitos produzem NO utilizando como substrato a L-arginina, reação essa catalisada pela enzima NO sintetase induzível (iNOS). O NO atua como leishmanicida, controlando a proliferação das formas amastigotas que estão presentes no interior dos macrófagos, sendo considerado uma das moléculas de maior importância para matar parasitos intracelulares (GRADONI; ASCENZI, 2004).

A ação da interleucina-4 (IL-4) sobre linfócitos Th0 leva à sua diferenciação e ativação em linfócitos Th2, o que também direciona a resposta imune para uma resposta humoral. Esse perfil de resposta, além de não conseguir controlar a disseminação e a replicação desses parasitos, também inibe a ativação de células Th1. As citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, como IL-4 e a interleucina-10 (IL-10) acabam impedindo a ativação dos macrófagos pela inibição da produção de IFN- γ ou pela sua inativação, fazendo com que os macrófagos também se mantenham inativados e os parasitos proliferem e disseminem no corpo do hospedeiro mamífero (AWASTHI *et al.*, 2004). Em relação aos isotipos de imunoglobulinas produzidas durante a resposta imune em camundongos, existe uma relação positiva entre IgG2a/Th1 e entre IgG1/Th2 (SHIMIZU *et al.*, 2003). O IFN- γ promove a mudança de classe de IgM para IgG2a, enquanto a IL-4 promove a mudança de classe do isotipo IgM para IgG1. Sendo assim, a cinética de produção de IgG2a/IgG1 pode ser utilizada como marcadores de uma indução de resposta Th1 ou Th2 em modelo murino (MOHAMMADI *et al.*, 2006).

Apesar de já estar bem consolidado que o padrão Th1 está relacionado com proteção e o padrão Th2 com susceptibilidade à doença, vários grupos de pesquisa têm observado que um perfil misto de resposta Th1/Th2, com um balanço entre as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ /TNF e citocinas reguladoras IL-10/IL-4 estão envolvidas na resolução da patologia causada por parasitos da espécie *L. donovani* (SINGH *et al.*, 2012; STOBER *et al.*, 2005). A imunização com a proteína A2, um fator de virulência presente nas formas amastigotas, foi capaz de conferir proteção contra a infecção de camundongo BALB/c por *L. donovani* com uma resposta associada a um padrão misto Th1/Th2 (GHOSH *et al.*, 2001). Além disso, estudos relacionados com a quimioterapia no tratamento contra a infecção por *L. donovani* mostrou que a IL-4 exerce um importante papel no controle da infecção (ALEXANDER *et al.*, 2000). Dessa forma, demonstra-se que citocinas produzidas por linfócitos Th2 podem auxiliar na proteção contra a infecção causada por *L. donovani*, e que um padrão misto pode ser explorado para a produção de uma possível vacina contra a LV.

2.6 Tratamentos e vacinas para a LV

As opções de tratamento para a LV em geral atualmente são limitadas ao uso de antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira linha, e à anfotericina B ou à pentamidina como segundas opções de tratamento. Outros fármacos em estudo nos últimos anos e que recentemente passaram a ser utilizados para o tratamento da LV são a miltefosina e paromomicina (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes permanece desconhecido. Esses agentes parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato pelo parasito, e influenciar a atividade microbicida dos macrófagos. Porém, eles possuem vários efeitos colaterais como cardiotoxicidade, indução de pancreatite e nefrotoxicidade (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A anfotericina B possui uma ótima atividade leishmanicida, com taxas de cura elevadas de acordo com estudos realizados em áreas endêmicas para LV. Esse fármaco interage com um esteroide presente na membrana do parasito, o ergosterol, aumentando a permeabilidade da *Leishmania* e causando a sua lise, além de ter efeitos moduladores de resposta imune, como aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de proliferação de células T efectoras. A pentamidina atua interferindo na síntese de DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas do parasito, o que resulta em alteração na morfologia do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial. A miltefosina, que foi desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer, é o primeiro fármaco oral eficaz para o tratamento da LV em humanos. Ele age por meio da modulação de receptores presentes na superfície do parasito que levam à apoptose desse protozoário. Já paromomicina atua modificando a fluidez de membrana do parasito, interferindo na função dos ribossomos e no potencial da membrana mitocondrial da *Leishmania* (ROATT *et al.*, 2014). É importante ressaltar que, devido ao aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes e toxicidade dos medicamentos de segunda linha, o desenvolvimento de vacinas contra essa doença tornou-se altamente necessário (CIFANI *et al.*, 2012).

Várias evidências a partir de estudos com modelos animais indicam que uma proteção sólida pode ser obtida por intermédio de imunizações com vacinas formuladas com proteínas do parasito se comportando como imunógenos (MUTISO *et al.*, 2013). A vacinação como profilaxia seria uma estratégia eficaz no controle da infecção e propagação da doença. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a LV tornou-se cada vez mais o foco de vários grupos de pesquisa, como mostra a quantidade de

informações genéticas e biológicas sobre o parasito, experimentos imunológicos e disponibilidade de vacinas que oferecem proteção em experimentos animais contra desafios com diferentes espécies de *Leishmania* (GIUNCHETTI *et al.*, 2008; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008; PASSERO *et al.*, 2012a; RESENDE *et al.*, 2013; ROATT *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2003; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2013).

As primeiras tentativas de vacinação, denominadas como leishmanização, foram baseadas sobre a observação de que, após a cura das lesões cutâneas, os indivíduos se tornavam resistentes a infecções subsequentes. Nessa técnica, formas vivas de *L. major* são introduzidas em pequenas quantidades em regiões não expostas do corpo, com o intuito de que o indivíduo desenvolva a lesão cutânea e, posteriormente, apresente cura espontânea e proteção contra a uma infecção subsequente (MUTISO *et al.*, 2013). A imunização subcutânea de camundongos com *L. donovani* apresentou um padrão misto de resposta Th1/Th2 que conferiu proteção contra LV. Porém essa forma de imunização deixou de ser recomendada, uma vez que um número significativo de pacientes não apresenta cura espontânea, necessitando de tratamento médico (MCCALL *et al.*, 2013b).

As vacinas de primeira geração, baseadas na utilização de parasitos mortos ou atenuados, substituíram a leishmanização. Esse tipo de vacina é considerado padrão ouro para proteção contra doenças causadas por parasitos intracelulares. A utilização de parasitos vivos atenuados é importante na vacinação devido à mimetização do curso natural da doença, permitindo que todo o espectro de antígenos seja apresentado para o sistema imunológico de maneira semelhante à que ocorre quando o parasito infecta em condições naturais. Porém, a sua utilização é limitada devido à possibilidade de reversão da virulência e reativação em indivíduos imunossuprimidos (NOAZIN *et al.*, 2008).

As vacinas de segunda geração são baseadas nas subunidades dos parasitos, podendo ser utilizadas, por exemplo, moléculas de superfície de *Leishmania* que sejam imunogênicas e estimulem uma resposta imune protetora, ou moléculas que sejam importantes para a virulência do protozoário, que podem ser bloqueadas pela ação de componentes do sistema imune ativado no processo de imunização, culminando no impedimento da infecção. Alguns antígenos presentes na membrana do protozoário foram intensamente estudados. Dentre essas moléculas pode-se citar a enzima esterol metiltransferase (SMT) responsável pela produção de esterol da membrana do parasito (GOTO *et al.*, 2009), o lipofosfoglicano (LPG) (SRIVASTAVA *et al.*, 2013), a glicoproteína gp63 (OLIVIER *et al.*, 2012), ligante de fucose e manose (FML) (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2009), e o fator

de virulência A2 (GHOSH *et al.*, 2001; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012). Já as vacinas de terceira geração utilizam as informações genéticas dos patógenos, introduzindo genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos imunogênicos em vetores virais ou em DNA plasmidial (PASSERO *et al.*, 2012a; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005).

Apesar do desenvolvimento de uma vacina para a prevenção dessa parasitose ser uma meta que perdura há mais de um século, ainda não existe uma vacina que seja eficaz na profilaxia das leishmanioses para diminuir os casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH). Porém, existem vacinas para a imunização dos cães, como a Leishmune[®] e a Leish-Tec[®], ambas licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde. A Leishmune[®] é composta por uma fração glicoproteica purificada, o ligante Fucose-Manose, obtido do extrato inativado de *L. donovani*. Essa vacina obteve aproximadamente 80% de eficácia na proteção contra a LVC no Brasil (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008). Já a Leish-Tec[®] possui em sua formulação o antígeno A2, presente nas amastigotas, sob a forma de proteína recombinante. Recentemente essa vacina foi testada em cães de áreas endêmicas para a LVC, e como resultado 92,9% dos cães permaneceram saudáveis (FERNANDES *et al.*, 2014b). A utilização dessas vacinas contra a LVC pode ajudar a quebrar o principal elo de transmissão para o ser humano, o cão, que atua como reservatório do parasito, além de fornecer informações para o desenvolvimento de vacinas que possam ser utilizadas em humanos (TESH, 1995; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2008).

Além dos antígenos utilizados na formulação das vacinas, a presença de um adjuvante muitas vezes é indispensável para a obtenção de uma resposta imune intensa e duradoura (MCKEE *et al.*, 2007). As vacinas licenciadas citadas acima utilizam como adjuvante a saponina, que é indutora de uma intensa resposta imune Th1 e produção de IgG2a em camundongos, bem como concomitante resposta Th2 (LIU *et al.*, 2002). Um outro adjuvante utilizado nas formulações vacinais, o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF), além de estimular resposta humoral, também é capaz de estimular um padrão misto de citocinas anti/proinflamatórias como IL-4/IFN- γ (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012), justificando a sua utilização para a obtenção de um padrão misto que muitos trabalhos mostram que pode proteger em contra a LV (FERNANDES *et al.*, 2014b; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012).

2.7 Lectinas e a sua utilização como imunógeno

Como abordado anteriormente, várias moléculas presentes no parasito, consideradas como fatores de virulência, vêm sendo intensamente pesquisadas e utilizadas como imunógenos em vacinas de segunda geração (OLIVIER *et al.*, 2012; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012; ABDIAN *et al.*, 2011). Entre esses fatores de virulência pode-se citar as lectinas, um grupo de proteínas ubíquas que se ligam reversivelmente a carboidratos solúveis ou presentes em glicolípídeos ou glicoproteínas que estão presentes na estrutura do parasito e que podem estar envolvidas em processos infecciosos. Essas proteínas são amplamente distribuídas tanto em microrganismos, plantas ou animais e estão envolvidas em vários processos celulares que dependem de sua especificidade em reconhecer carboidratos complexos. Essa característica fez com que as lectinas se tornassem candidatos a agentes terapêuticos antiparasitários, antivirais ou até mesmo antitumorais uma vez que o processo de reconhecimento de hidratos de carbono pode afetar a regulação das células via glicoconjugados, o processo de interação de patógenos e as células hospedeiras e a comunicação célula-célula (OGAWA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2013). Na literatura, diversos trabalhos evidenciam a participação de lectinas presentes em células do hospedeiro no processo de reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de diferentes espécies de patógenos (PIPIROU *et al.*, 2011; VAN, V *et al.*, 2010), inclusive parasitos do gênero *Leishmania* (ANDRADE; SARAIVA, 1999; GHOSHAL *et al.*, 2009). Muitas vezes esse reconhecimento implica na modulação da resposta imunológica do hospedeiro, devido à ativação de vias de sinalização a partir da estimulação das lectinas de superfície das células do sistema imune por carboidratos presentes nos patógenos (VAN, V *et al.*, 2010). Trabalhos recentes mostram lectinas que possuem uma forte ação anti-HIV, como a lectina isolada da alga *Griffithsia* sp, que se liga especificamente à proteína gp120 presente no envelope viral e que está envolvida na entrada do vírus nas células por interação com o receptor CD4. A cyanovirina, lectina isolada da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum* também possui atividade contra o vírus da AIDS (OGAWA *et al.*, 2011).

Por sua vez, lectinas presentes nos parasitos também estão envolvidas nos processos infecciosos por protozoários que causam doenças importantes em seres humanos. Proteínas Ligantes de Heparina (PLH) presentes na superfície de formas infectantes de *Trypanosoma cruzi*, estão envolvidas nos processos de adesão de amastigotas a células do hospedeiro e de epimastigotas ao epitélio intestinal de

triatomíneos (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011; OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2008; OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2012). Lectinas ligantes de galactose e de N-acetyl-galactosaminas, presentes na superfície de *Entamoeba histolytica*, são fatores de virulência importantes para a infecção por este protozoário, que é responsável pelo terceiro maior número de casos de morte por doenças parasitárias no mundo, depois da malária e da esquistossomose. Formas trofozoítas móveis deste parasito se aderem e invadem a mucosa do indivíduo infectado, podendo, por intermédio da disseminação pela circulação sanguínea, causar abscessos extraintestinais, principalmente no fígado. As lectinas mencionadas são importantes tanto para os processos de adesão quanto de citotoxicidade desta espécie de *Entamoeba*, diferentemente do que acontece com outras espécies não virulentas, como *E. coli* ou *E. dispar* (CANO-MANCERA; LOPEZ-REVILLA, 1987; SAFFER; PETRI, JR., 1991).

Na literatura são encontrados, também, alguns trabalhos que mostram a presença de lectinas na membrana de *Leishmania* (LOVE *et al.*, 1993; SMITH; RANGARAJAN, 1995; SVOBODOVA *et al.*, 1997). Há evidências de que lectinas de ligação a heparina presentes na superfície desses parasitos participam da regulação de atividades biológicas da célula hospedeira, participando, também diretamente na adesão e penetração dos parasitos nos tecidos e células, tanto dos hospedeiros vertebrados como de hospedeiros invertebrados. Experimentos realizados com formas promastigotas de *L. (L.) donovani* mostraram a capacidade dessa proteína de induzir a inibição da atividade da proteína cinase C do hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2012; BUTCHER *et al.*, 1992; OGAWA *et al.*, 2011). Estudos recentes mostraram a presença dessas proteínas em formas promastigotas de *L. (Viannia) braziliensis* e a influência das mesmas na adesão do parasito no intestino médio dos insetos vetores pelo reconhecimento de moléculas presentes no intestino de *Lu. intermédia* e *Lu. Whitmani* (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b; ZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007).

Trabalho recente realizado em nosso laboratório utilizando a técnica de purificação de proteínas por cromatografia líquida constatou a presença de PLHLc nas formas promastigotas de *L. chagasi*. Os anticorpos policlonais anti-PLHLc permitiram, ainda, a determinação da distribuição da lectina na superfície e no interior do parasito por intermédio de sua utilização em técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica. Os resultados obtidos demonstraram a distribuição da lectina de forma homogênea pela superfície do parasito e internamente próxima ao cinetoplasto do mesmo. Preliminar estudo do sequenciamento dessa proteína e comparação da mesma em bancos de dados da internet com proteínas de *Leishmania* nos forneceu dados que

sugerem a relação destas proteínas com o DNA de cinetoplasto, corroborando os resultados de imunolocalização acima descritos (dados não publicados).

O bloqueio da atividade dessa lectina que é um fator de virulência da *Leishmania*, objetivando a diminuição da infecciosidade do parasito ou, mais especificamente, sua utilização como estimuladoras do sistema imunológico induzindo uma resposta protetora contra infecções subsequentes são alvos de grande valor para o controle da forma visceral da leishmaniose em mamíferos, sejam eles humanos ou outros animais como o cão, um importante reservatório da doença, principalmente em áreas urbanas.

Portanto, o histórico da utilização de moléculas de superfície de patógenos como antígenos vacinais, a participação destas moléculas em processos de adesão na célula hospedeira e a confirmação da presença de ligantes de heparina na membrana do parasito dão embasamento para a utilização dessa proteína em experimentos de imunização. Para isso, torna-se importante avaliar a proliferação celular, o perfil da produção de citocinas, óxido nítrico e de isotipos de anticorpos induzidos pela vacinação com a PLH de L. chagasi, o que nos orientará para o delineamento de uma formulação vacinal que possa auxiliar no controle da doença em mamíferos como o cão e o próprio homem.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a imunogenicidade induzida após imunização de camundongos BALB/c com proteína ligante de heparina de *L. chagasi* (PLHLc) associado ou não com o adjuvante incompleto de Freund (AIF).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a proliferação celular de esplenócitos de camundongos BALB/c frente ao estímulo com antígeno particulado de *L. chagasi* e PLHLc em cultura celular duas semanas após imunização dos animais com PLHLc;
- ✓ Avaliar o padrão de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) e de óxido nítrico (NO) produzidos por esplenócitos de camundongos BALB/c frente ao estímulo com antígeno particulado de *L. chagasi* e PLHLc em cultura celular duas semanas após imunização dos animais com PLHLc;
- ✓ Avaliar a resposta imunológica humoral anti-PLHLc por meio da avaliação da produção dos isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-PLHLc durante o experimento de imunização como marcadores de uma resposta Th2/Th1.

4. Material e métodos

4.1 Animal experimental

Camundongos BALB/c de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, sendo mantidos e manuseados no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, onde permaneceram em ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h e receberam água e alimento *ad libitum*. A experimentação animal foi feita respeitando princípios éticos do Código Profissional do Médico Veterinário, de acordo com o parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV- Projeto de pesquisa-processo número: 104/13).

4.2 Obtenção dos parasitos

Formas promastigotas totais de *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi* cepa (MHOM/BR/75/M2682), mantidas em cultura em laboratório, foram inoculadas em camundongos BALB/c (1×10^7 parasitos/100 μ L de tampão PBS (Salina Tamponada com Fosfato), pH 7,2, aplicados intravenosamente pela veia da cauda) para recuperação de novos parasitos, conforme descrito resumidamente a seguir: 28 dias após a infecção os animais foram eutanasiados e deles foram retirados o baço e o fígado que foram macerados e diluídos em placa de 24 poços pela técnica de diluição seriada, em meio de Grace[®] (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL) e penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) (Grace completo). A placa foi mantida em estufa a 26°C. Parasitos provenientes dessa cultura foram utilizados diretamente em experimentos posteriores ou estocados em nitrogênio líquido (-196°C).

4.3 Cultura dos parasitos e obtenção de extrato proteico solúvel de *L. chagasi*

Formas promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas partindo de cultura com densidade celular de 10^5 células/mL em meio Grace completo, pH 6,5, a 26°C. No quinto dia de cultura o material foi centrifugado a $1540 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min e os parasitos

lavados 2 vezes com PBS, pH 7,2. O volume correspondente a aproximadamente 1×10^{13} parasitos foi suspenso em 75 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0 e lisados em sonicador (Q-Sonica), na frequência de 6 KHz realizando seis ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 min, sempre em banho de gelo. Todo o material resultante foi centrifugado a $7000 \times g/4^{\circ}\text{C}/20$ min para recuperação do sobrenadante de proteínas solúveis, sendo filtrado em membrana com poro de $0,45 \mu\text{M}$ de diâmetro e armazenado em gelo para a purificação de proteínas ligantes de heparina de *L. chagasi* (PLHLc).

4.4 Obtenção de antígeno particulado de *L. chagasi* (AgLc)

Para a obtenção do AgLc o volume correspondente a aproximadamente 1×10^7 parasitos foi suspenso em 3 mL de PBS, pH 7,2 e submetido a 17 ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido (-120°C) e aquecimento a 37°C em banho-maria para o rompimento da membrana dos parasitos. Após os ciclos o material foi visualizado ao microscópio ótico para a confirmação da lise dos parasitos e, em seguida, foi armazenado a -20°C .

4.5 Purificação de PLHLc do extrato parasitário

O extrato solúvel de *L. chagasi* (75 mL) foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose (volume leito de 1 mL). Para equilibrar e retirar o material não adsorvido à coluna foi utilizado tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0. A fração adsorvida foi eluída com o mesmo tampão acrescido de NaCl 2 M. A purificação foi realizada em sistema automatizado FPLC, com fluxo de 1 mL/min e monitorada pela leitura de absorbância em 280 nm. As frações eluídas foram coletadas e submetidas à técnica de cromatografia de exclusão molecular em coluna de dessaltilização “dessalting” (GE) (volume de leito de 1 mL), sendo utilizado para eluição o PBS. O material coletado foi alíquotado e armazenado a -20°C .

4.6 Dosagem de PLHLc e AgLc

Para determinar o conteúdo proteico das amostras de PLHLc foi utilizada a técnica do ácido bicinconínico (BCA), de acordo com metodologia descrita no “kit” BioAgency, código 600-0510N. O conteúdo proteico das amostras de antígeno particulado de *L. chagasi* foi determinado pela técnica de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

4.7 Análise eletroforética de PLHLc

Para confirmar a purificação de PLHLc foi realizada análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (GIBCO BRL). A quantidade de 50 µg de PLHLc foi precipitada com TCA 100% e suspensas em 4 µL de tampão de amostra (Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,5 contendo 2,5% de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol e 50% de glicerol) e 20 µL de uréia 8M e aplicadas no gel. A corrida eletroforética teve duração aproximada de 50 minutos a 80-120 mA e 190 V. Os géis foram corados por prata ou com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co.; Rockford, USA).

4.8 Experimentos de imunização

Para compor o teste de imunização foi utilizado um total de 32 camundongos BALB/c, que foram distribuídos aleatoriamente entre os 4 diferentes grupos avaliados. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com 3 doses dos tratamentos descritos abaixo, com intervalo de 15 dias entre cada dose. Um total de 4 grupos foram utilizados: **Grupo Controle** (200 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo AIF** (100 µL de AIF emulsificado em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo PLHLc** (PLHLc diluída em 200 µL de PBS, pH 7,2) e **Grupo PLHLc + AIF** (emulsão composta de PLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2 + 100 µL de AIF) (Figura 4). Foram utilizados 40 µg de PLHLc na primeira dose e 20 µg de PLHLc nas doses de reforço nos grupos PLHLc e PLHLc + AIF.

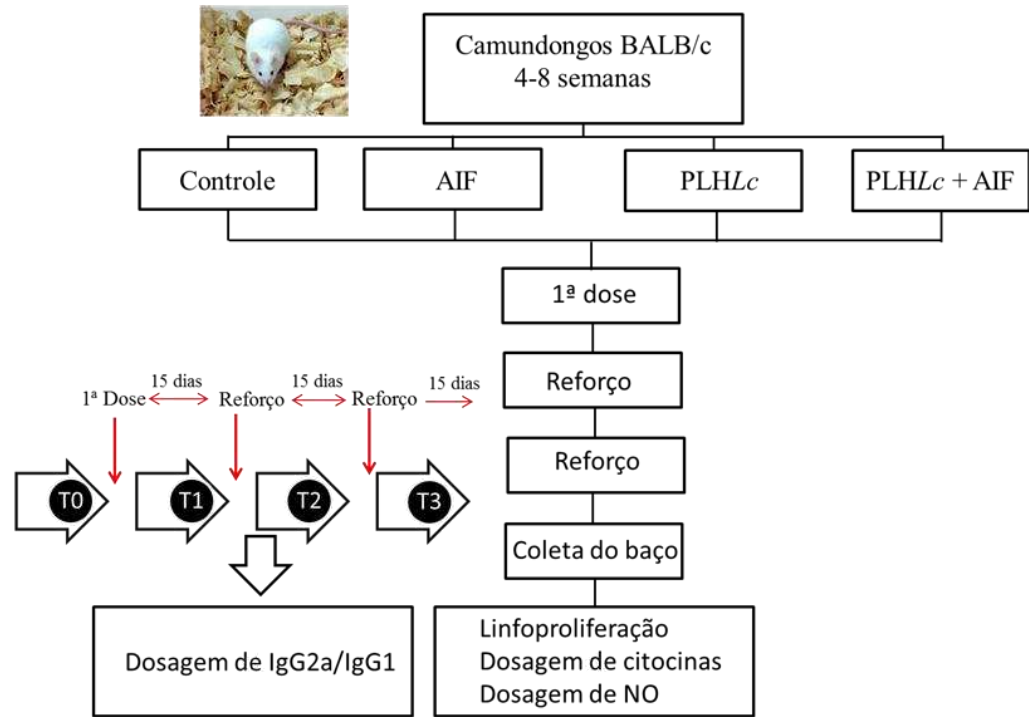


Figura 4: Experimento de imunização. Delineamento experimental do protocolo de imunização.

4.9 Obtenção de soro para detecção dos isotipos IgG1/IgG2a

Durante o teste de imunização foram obtidos 400 μL de sangue dos camundongos sempre antes de cada imunização nos tempos: **T0** (antes da primeira imunização para a obtenção do soro pré-imune); **T1** (15 dias após a primeira imunização); **T2** (15 dias após a segunda imunização); **T3** (15 dias após a terceira imunização) (Figura 4). Após coagulação espontânea em temperatura ambiente, o material foi centrifugado a $520 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min para a obtenção do soro dos camundongos. Foi feito um *pool* de soro dos grupos com a finalidade de acompanhar a cinética de produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a durante todo o experimento.

4.10 Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas, óxido nítrico e ensaio de linfoproliferação

A dosagem de citocinas, NO e o ensaio de linfoproliferação foram realizados a partir de cultura de esplenócitos. Para isso o baço dos camundongos imunizados foram retirados sob condição de esterilidade em fluxo laminar e macerados em meio de lavagem de células, pH 7,2 constituído por RPMI-1640 com bicarbonato de sódio, suplementado com SFB inativado a $56^\circ\text{C}/30$ min e $20 \mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina. A suspensão de células foi submetida a centrifugação a $1.200 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min em tubo

cônico de 15 mL, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi incubado com tampão de lise de hemácias (Tris-HCL 0,7 M/cloreto de amônio 0,16 M), pH 7,3 por 7' em gelo e na ausência de luz. Após essa incubação as células foram submetidas a dois novos ciclos de centrifugação, eliminando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em 10 mL do meio de lavagem. As células da suspensão foram diluídas em meio de lavagem, coradas com igual volume de azul de Trypan a 0,4% em PBS e contadas. As células viáveis foram ajustadas para 5×10^5 células por poço para o ensaio de linfoproliferação e 1×10^7 células por mL para a dosagem de citocinas e NO. Para a dosagem das citocinas e produção de NO as células foram estimuladas com 2 µg de PLHLc ou 50 µg de AgLc em cada poço em estufa com atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 72 h. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado de cada poço e armazenado a -20°C para posterior análise.

4.11 Ensaio de linfoproliferação

Para o ensaio de linfoproliferação as células foram estimuladas com 0,1 µg de PLHLc ou 2,5 µg de AgLc em cada poço de microplaca de 96 poços e incubadas durante 44 h em estufa com atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período a cultura foi submetida a ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Resumidamente, 50 µL do meio de cultura de cada poço foram substituídos por 50 µL de MTT e as placas foram submetidas às mesmas condições de incubação anteriores durante 2 h para a metabolização do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente, foram retirados 90 µL do sobrenadante de cada poço e adicionaram-se 100 µL de DMSO (dimetilsufóxido) para a solubilização dos cristais de formazan. Após a diluição completa dos cristais a placa foi levada para leitura a 570 nm no leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO, sendo a quantidade de cristais de formazan formados diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes em cada poço. Para o controle positivo de proliferação foi utilizado 0,2 µg/poço do mitógeno concanavalina A (ConA) para confirmação da viabilidade das células durante o processo.

4.12 Dosagens de IFN-γ, IL-4 e IL-10

As citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 foram dosadas usando “kits” de ELISA de captura específico para citocinas de camundongos (PEPROTECH, Rocky Hill, NJ,

USA), seguindo instruções do fabricante. Para sensibilização das placas, anticorpos de captura das citocinas a serem analisadas foram diluídos em PBS e imediatamente colocados em placas de 96 poços (100 µL/poço). A placa foi mantida “overnight” em temperatura ambiente, passando posteriormente por três lavagens com tampão carbonato contendo 0,05% de Tween 20, solução utilizada para a lavagem das placas. Foi adicionada, então, solução de bloqueio (300 µL) a cada poço, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 1 h e lavada novamente por três vezes. As amostras e o padrão de cada citocina foram adicionados (100 µL/poço) e as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente, passando posteriormente por duas lavagens. Para detecção, anticorpos secundários biotinizados foram usados (100 µL/poço) e as placas foram incubadas por duas 2 h em temperatura ambiente e lavadas duas vezes. A reação foi revelada com estreptavidina conjugada com peroxidase e ABTS (Ácido 2,2 -bis -azino 3 -etilbenzil -thiazol -6-sulfônico) na presença de H₂O₂. A leitura foi feita no leitor Thermo Scientific -Multiskan™ GO sob luz de 490 nm.

4.13 Dosagem de óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como medida da produção de óxido nítrico (GREEN *et al.*, 1982). Em placa de fundo chato de 96 poços, uma curva padrão foi preparada pela adição de 50 µL de padrão de nitrito de sódio 250 µM, em duplicata, a 50 µL de RPMI, pH 7,2 realizando-se, a partir daí, 8 diluições sucessivas 1:2 em poços contendo 50 µL do mesmo meio. Em seguida, foram adicionados, em duplicata, 100 µL de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%) a 50 µL de sobrenadante de cultura (amostra), 50 µL de RPMI, pH 7,2 (branco) e aos poços dos padrões. Após 10' de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das amostras, branco e padrões sob luz com comprimento de onda de 570 nm no leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO.

4.14 Dosagem de IgG1 e IgG2a

Os isotipos IgG1 e IgG2a do soro dos camundongos dos diferentes grupos foi determinado pela técnica de ELISA. Placas de fundo chato de 96 poços foram sensibilizadas com solução de PLHLc em tampão carbonato pH 9,6 (1 µg/poço)

“overnight” a 4°C. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi descartado para o bloqueio com solução de gelatina 2% por 30 minutos em temperatura ambiente. O volume foi descartado e as placas foram lavadas com tampão PBS contendo 1% de Tween 20. Amostras dos soros diluídas 1:40 foram acrescentadas e a placa foi incubada durante 2 h em temperatura ambiente. Após etapas de lavagem foram acrescentados os anticorpos secundários anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo produzidos em cabra, conjugados com peroxidase (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc., Santa Cruz, CA, USA) por um período de incubação de 2 h em temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, foi acrescentada solução reveladora orto-fenil-diamina (OPD) em tampão citrato-fosfato 0,15 M, pH 5,0 acrescido de H₂O₂. A reação foi interrompida com o acréscimo de H₂SO₄ 1,5 M. A leitura foi realizada no leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO sob luz com comprimento de onda de 490 nm.

4.15 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey para calcular as diferenças entre os grupos. Para as análises, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Em alguns casos, foi utilizado o teste *t* de Student não pareado para comparação entre as amostras.

5. Resultados

5.1 Análise da purificação de PLHLc

Para verificar a purificação da PLHLc, 50 µg de proteína purificada foi aplicada em gel SDS-PAGE em condição não redutora, revelando, após a corrida eletroforética e coloração por prata, a presença de banda de 105 kDa (Figura 5) reconhecida por anticorpos policlonais antiPLHLc em “Western blotting” (dados não mostrados).

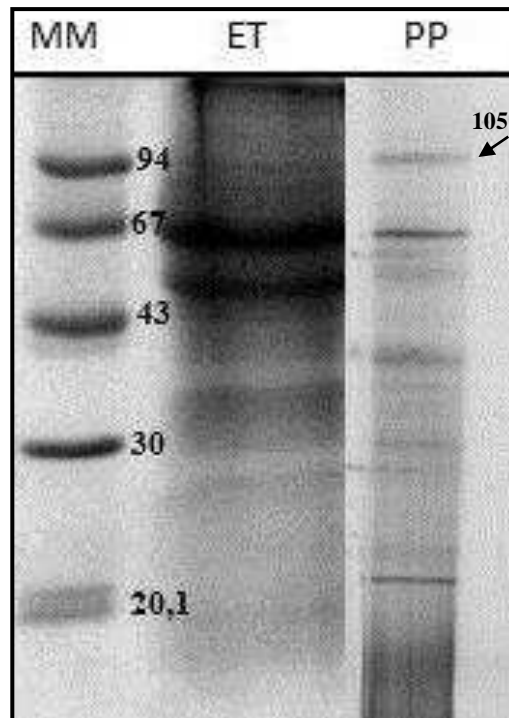


Figura 5: Avaliação da purificação de PLHLc de extrato total de formas promastigotas de *L. chagasi*. Proteínas do extrato total de *L. chagasi* (ET), extrato proteico purificado (PP) e o marcador de massa molecular em kDa (MM) foram submetidos a SDS-PAGE e corados por prata, conforme descrito na metodologia. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

5.2 Avaliação da proliferação celular de esplenócitos murinos estimulados com PLHLc ou AgLc após a imunização dos animais com PLHLc

A avaliação da capacidade de proliferação celular de células esplênicas *in vitro* após o término do protocolo de imunização foi feita utilizando dois estímulos diferentes: AgLc ou PLHLc, o que possibilitou a avaliação de uma resposta antígeno-específica frente a antígenos relacionados com *L. chagasi*.

Observou-se um aumento significativo da proliferação celular nos grupos PLHLc e PLHLc + AIF após estímulo com AgLc e PLHLc em relação a seus respectivos controles não estimulados (Figura 6). Como controle positivo de proliferação celular foi utilizado o mitógeno ConA para confirmar a viabilidade das células nos diferentes grupos avaliados.

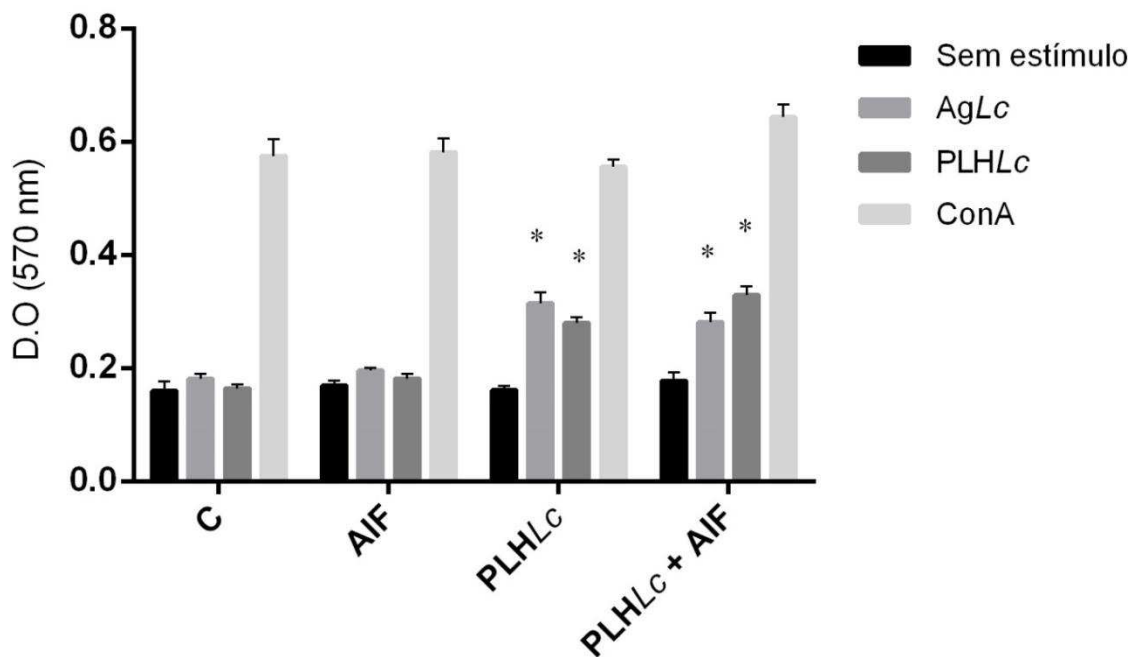


Figura 6: Análise da proliferação celular *in vitro* de células esplênicas murinas após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram estimulados com AgLc, PLHLc ou ConA e a proliferação celular foi mensurada por ensaio colorimétrico baseado na conversão do MTT em cristais de formazan. Foram utilizados 4 camundongos por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes. Diferenças entre a proliferação celular pelos grupos estimulados e seus respectivos controles não estimulados foram determinados pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.3 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) produzidas por esplenócitos estimulados com *AgLc* e *PLHLc* após imunização de camundongos BALB/c com *PLHLc*

Com o objetivo de avaliar se a imunização com *PLHLc* foi capaz de induzir a produção de citocinas relacionadas com uma resposta Th1 ou Th2, foi feita a dosagem de IFN- γ , IL-4 e IL-10 em sobrenadante de cultura de esplenócitos após estímulo antigênico com *AgLc* ou *PLHLc* duas semanas após o término do protocolo de imunização, conforme descrito na metodologia.

5.3.1 Produção de IFN- γ

Esplenócitos do grupo imunizado com *PLHLc* produziram quantidades significantes de IFN- γ quando estimulados com *AgLc* em relação à cultura de esplenócitos estimulados com *PLHLc* ou sem estímulo. No grupo que foi imunizado com *PLHLc* + AIF também houve aumento na produção de IFN- γ por células do baço que foram estimuladas com *AgLc*, porém esse aumento ocorreu somente em relação à sua respectiva cultura não estimulada. Além disso, foi observada diferença na produção dessa citocina quando comparamos os grupos *PLHLc* e *PLHLc* + AIF, mostrando que no primeiro grupo houve uma maior produção de IFN- γ frente ao estímulo com *AgLc* (Figura 7).

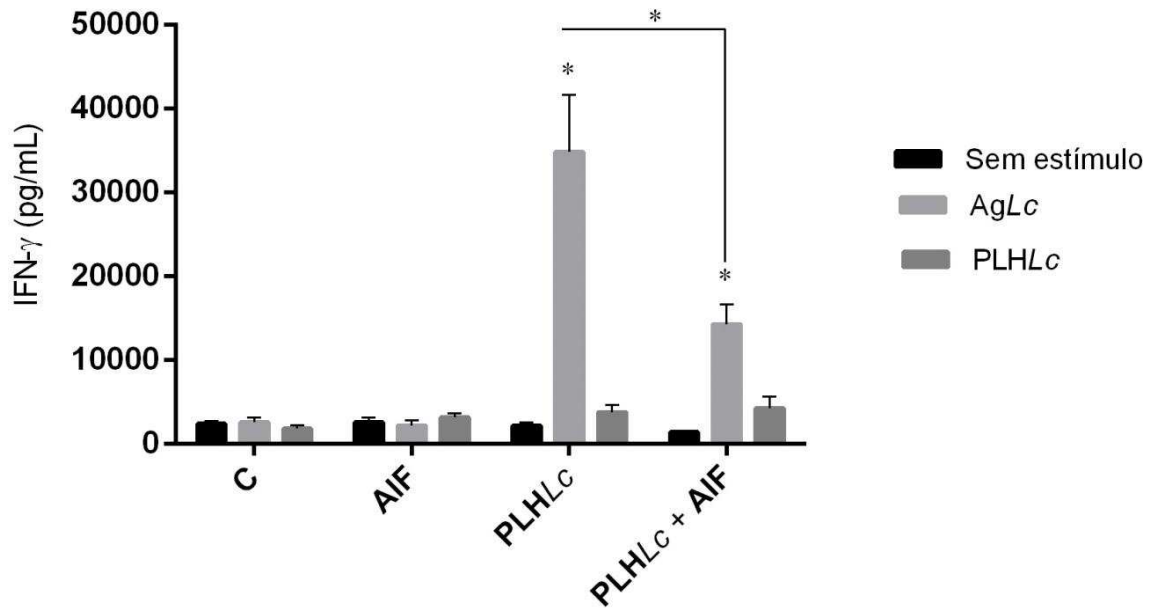


Figura 7: Produção de IFN- γ por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLC associada ou não com AIF. Duas semanas após o último reforço da imunização, camundongos BALB/c foram eutanasiados e IFN- γ foi dosado por ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos a estímulos com PLHLC, AgLc ou sem estímulo. Foram utilizados 4 animais por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes. Diferenças na produção de IFN- γ entre os grupos analisados foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.3.2 Produção de IL-4

Foi observado um aumento, se comparadas as médias, da produção de IL-4 no grupo PLHLC após os estímulos utilizados em relação ao grupo não estimulado, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo. Esplenócitos de camundongos imunizados com PLHLC + AIF e estimulados em cultura com PLHLC produziram quantidades significantes de IL-4 em relação à respectiva cultura não estimulada. Não houve diferença na produção de IL-4 quando os grupos imunizados com PLHLC ou PLHLC + AIF foram comparados entre si (Figura 8).

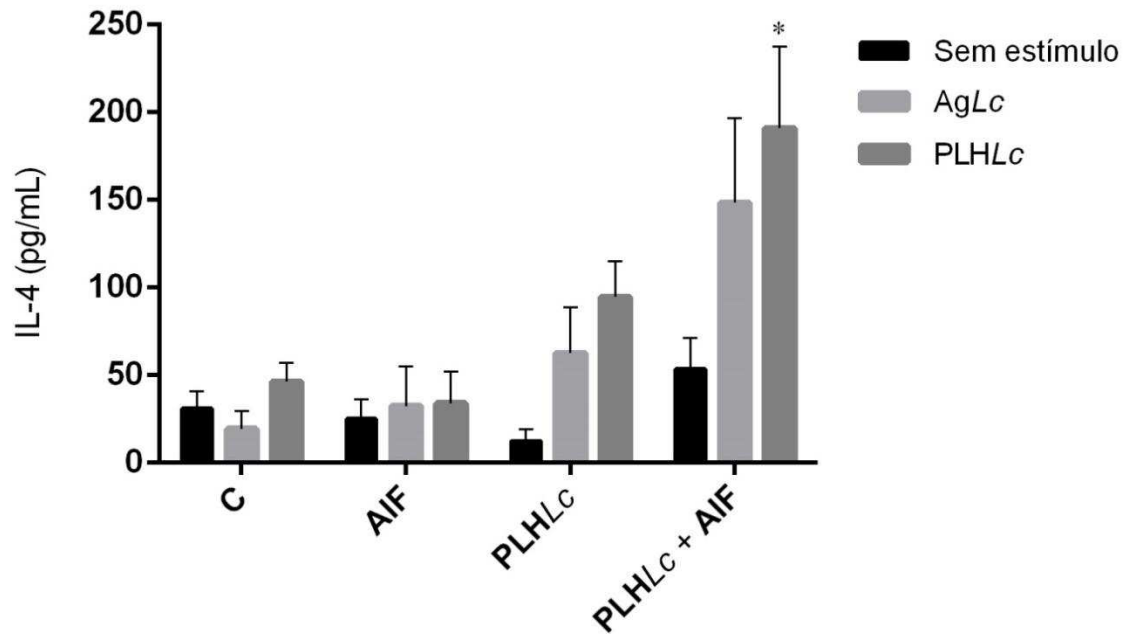


Figura 8: Produção de IL-4 por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF. Duas semanas após o último reforço da imunização, camundongos BALB/c foram sacrificados e IL-4 foi dosado por ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos a estímulos com PLHLc, AgLc ou sem estímulo. Foram utilizados 4 animais por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes. Diferenças na produção de IFN- γ entre os grupos analisados e as respectivas culturas não estimuladas foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.3.3 Produção de IL-10

Culturas de esplenócitos de camundongos imunizados com PLHLc e PLHLc + AIF estimuladas com AgLc produziram quantidades significantes de IL-10 quando comparadas com suas respectivas culturas sem estímulo ou estimuladas com PLHLc, porém não houve diferença quando os grupos imunizados foram comparados entre si (Figura 9).

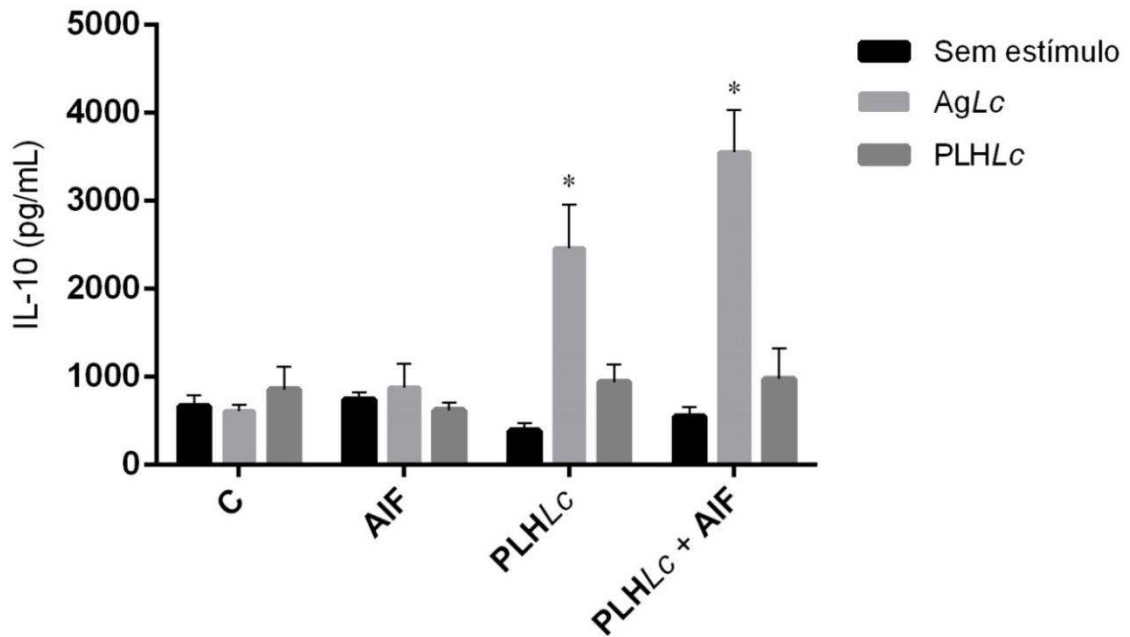


Figura 9: Produção de IL-10 por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF. Duas semanas após o último reforço da imunização, camundongos BALB/c foram sacrificados e IL-10 foi dosada por ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos aos estímulos com PLHLc, AgLc ou sem estímulo. Foram utilizados 4 animais por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-10 pelos grupos estimulados com AgLc e seus respectivos controles não estimulados ou estimulados com PLHLc foram determinados pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.4 Avaliação da produção de NO produzidas por esplenócitos estimulados com AgLc e PLHLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc

Como o NO possui grande importância para a eliminação de parasitos intracelulares como a *Leishmania*, sua produção por células fagocitárias do baço foi avaliada indiretamente pela análise de nitrito em sobrenadante de cultura de esplenócitos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais, estimulados ou não com AgLc ou PLHLc.

Conforme mostrado na figura 10, foi observado um aumento dos níveis de NO no grupo PLHLc e no grupo PLHLc + AIF na cultura estimulada com AgLc em relação as suas respectivas culturas sem estímulo e estimuladas com PLHLc. Além disso, a cultura estimulada com AgLc do grupo PLHLc apresentou níveis de NO maiores que a cultura submetida ao mesmo estímulo do grupo PLHLc + AIF.

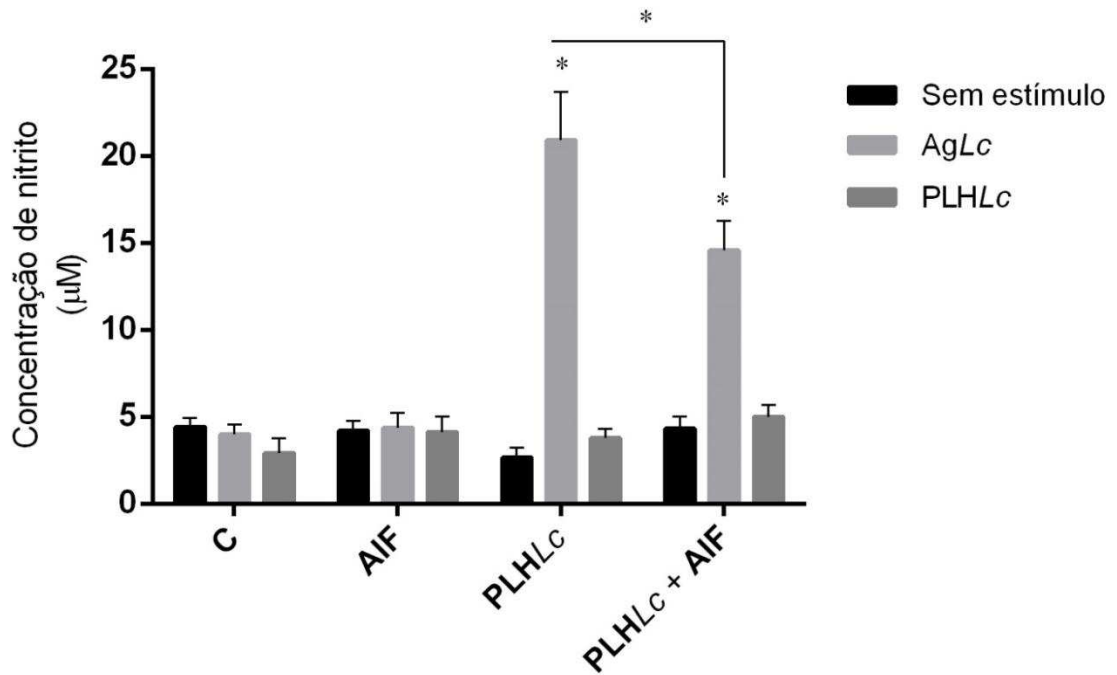


Figura 10: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLC associada ou não com AIF. Duas semanas após o último reforço da imunização, camundongos BALB/c foram eutanasiados e nitrito foi dosado pelo método de Greiss, como indicativo da produção de NO, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos aos estímulos com PLHLC, AgLc ou sem estímulo. Foram utilizados 4 camundongos por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes. Diferenças estatísticas na produção de nitrito entre os grupos analisados foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.4 Dosagem dos isotipos IgG2a e IgG1 anti-PLHLC

Para a avaliação da resposta humoral específica anti-PLHLC e verificação do perfil de resposta Th1/Th2, a produção dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-PLHLC foi mensurada no soro de camundongos controle e imunizados com AIF, PLHLC e PLHLC + AIF. Para atingir tal objetivo, foi acompanhada a cinética da produção desses anticorpos, obtendo o soro dos animais nos tempos: T0 (antes do início da imunização), T1 (15 dias após a 1ª imunização), T2 (15 dias após a 2ª imunização) e T3 (15 dias após a última imunização).

5.4.1 IgG2a

Foi observada produção significativa de IgG2a anti-PLHLC no tempo T3 do grupo imunizado com PLHLC quando comparada com a dos outros tempos do próprio grupo. Os camundongos que foram imunizados com PLHLC associada ao AIF mostrou maior produção de IgG2a anti-PLHLC nos tempos T2 e T3 quando comparados com T0. Em relação à cinética de produção desse isotipo de imunoglobulina, pode se observar um aumento gradativo de IgG2a a cada dose de imunização tanto no grupo PLHLC quanto no grupo PLHLC + AIF, sendo que em T3 houve uma maior produção de IgG2a (Figura 11).

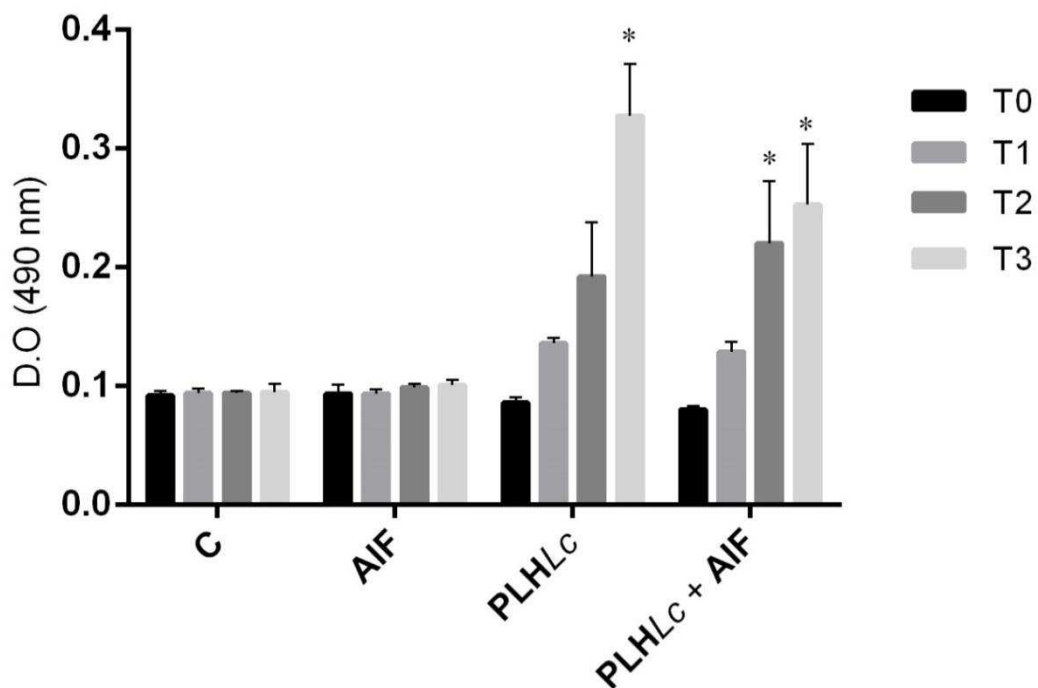


Figura 11: Cinética da produção de IgG2a anti-PLHLC por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLC associada ou não com AIF. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado nos tempos T0, T1, T2 e T3, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG2a anti-PLHLC foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG2a na amostra analisada. Foi utilizado “pool” do soro de 4 camundongos por grupo. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 3 experimentos independentes. Diferenças na produção de IgG2a entre os grupos analisados foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.4.2 IgG1

Em relação à produção de IgG1, foi observado um padrão diferente de produção de IgG2a entre os grupos imunizados na presença ou não de adjuvante. Houve maior produção de IgG1 anti-PLHLc em T3 no grupo PLHLc do que em T0 do mesmo grupo. Já nos animais que foram imunizados com PLHLc associado com AIF, a produção foi maior em T2 e em T3 em relação ao respectivo T0. Além disso, o grupo imunizado com PLHLc + AIF apresentou um aumento na produção desse isotipo em T3 quando comparado com o mesmo tempo do grupo PLHLc. Como também foi observado também em relação à cinética de IgG2a, houve um aumento gradual da produção de IgG1, sendo o pico de produção em T3 para ambos os grupos imunizados.

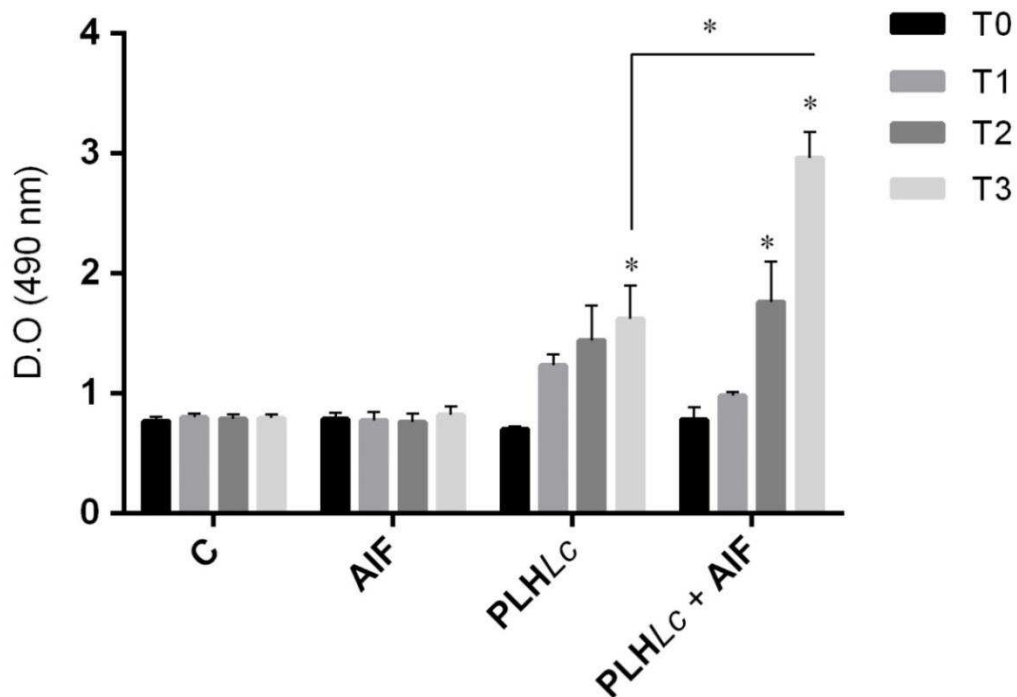


Figura 12: Cinética da produção de IgG1 anti-PLHLc por esplenócitos murinos após imunização intraperitoneal com PLHLc associada ou não com AIF. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado nos tempos T0, T1, T2 e T3, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG1 anti-PLHLc foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG1 na amostra analisada. Foi utilizado “pool” do soro de 4 camundongos por grupo. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 3 experimentos independentes. Diferenças na produção de IgG2a entre os grupos analisados foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

5.4.3 Razão IgG1/IgG2a

A relação IgG1 e IgG2a foi analisada em cada tempo de imunização: T0, T1, T2 e T3, conforme descrito na metodologia. Valores acima ou abaixo dos encontrados no grupo controle demonstram direcionamento para resposta Th2 ou Th1, respectivamente. Como observado na figura 13, imunização com PLHLC direcionou a resposta para Th1, enquanto que a imunização com PLHLC + AIF redirecionou a resposta para Th2, considerando ambas as avaliações feitas em T3. Vale ressaltar, inclusive, que houve uma tendência de maior relação IgG1/IgG2a no tempo T3 para o grupo imunizado com PLHLC + AIF comparado com o grupo controle no mesmo tempo (teste *t* de Student, $p=0,08$).

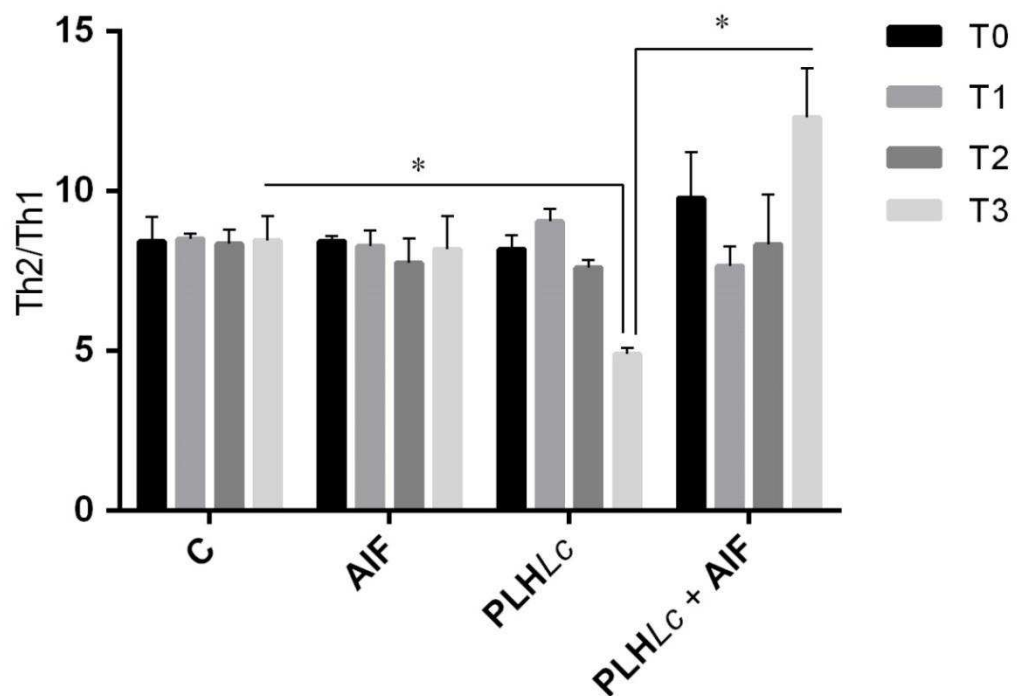


Figura 13: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos submetidos a diferentes protocolos de imunização conforme descrito na metodologia. A produção de IgG1 e IgG2a anti-PLHLC foi dosado em soro diluído 1:40 pela técnica de ELISA. Foi realizado a razão entre a produção de IgG1/IgG2. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinados pelo teste de comparação múltipla de Tukey ou teste *t* de Student (* $p<0,05$).

6. Discussão

No presente estudo, a PLHLc foi purificada e utilizada em experimentos de imunização como antígeno vacinal para avaliar sua imunogenicidade por meio da análise da proliferação celular, produção de citocinas e dos isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Apesar de alguns autores já terem descrito e caracterizado essa proteína em algumas espécies de *Leishmania* (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b; LOVE *et al.*, 1993; SMITH; RANGARAJAN, 1995; SVOBODOVA *et al.*, 1997; ZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007), não são encontrados na literatura trabalhos sobre a capacidade dessa lectina de *L. chagasi* de estimular o sistema imunológico do hospedeiro.

Uma primeira abordagem em relação à imunogenicidade foi avaliar se após exposição secundária de esplenócitos ao antígeno ocorreria proliferação de clones de linfócitos específicos para o imunógeno utilizado nos experimentos de imunização, a PLHLc. Nossos dados mostraram que, após imunização *in vivo* de camundongos BALB/c com PLHLc na presença ou não de AIF, o reestímulo de esplenócitos *in vitro* com PLHLc ou com antígeno particulado de *L. chagasi* (AgLc) levou à proliferação de linfócitos, diferentemente do que aconteceu com as células dos animais não vacinados, o que demonstra o potencial mitogênico específico dessa proteína.

Em relação ao padrão esplênico de produção de citocinas, houve aumento dos níveis de IFN- γ e IL-10 no grupo PLHLc frente ao estímulo com AgLc, e não houve produção significativa de IL-4. O IFN- γ é considerado uma citocina muito importante para o controle da proliferação da *Leishmania* (KIMA; SOONG, 2013), atuando na ativação dos macrófagos, o que leva à produção de NO, resultando no controle da proliferação do parasito pelas ações microbidas do óxido nítrico (DING *et al.*, 1988). A IL-10 é uma citocina responsável por manter a homeostase das reações imunes, fazendo com que o sistema imunológico volte ao seu estado de equilíbrio após a erradicação de uma infecção. Esse aumento dos níveis de IL-10 pode ser uma resposta do sistema imune dos animais aos níveis de IFN- γ que foram observados nesse grupo, ou seja, a presença dessa citocina é importante para que exista um controle da resposta imunológica, para que a própria reação contra o patógeno não cause danos ao hospedeiro (GHALIB *et al.*, 1993). Além disso, a presença de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras se faz necessária não somente para a homeostase do sistema imune, mas também para o desenvolvimento de uma vacina segura e mais eficiente (TAYLOR, 1995). Os níveis insignificantes de IL-4 observados nesse grupo são

importantes, uma vez que essa citocina é considerada por muitos autores como supressora e mediadora da resposta imune Th1 e Th2 respectivamente (NELMS *et al.*, 1999; HASBOLD *et al.*, 1999). A importância da resposta imune Th1 frente à infecção por *Leishmania sp* é bem descrita na literatura. A imunização de camundongos com proteínas purificadas de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) shawi* que estão associadas com processos fisiológicos do parasito confere proteção contra o desafio com formas promastigotas de *L. (V.) shawi*, associada a resposta Th1 com altos níveis de IgG2a, IFN- γ e proliferação celular após estímulo com extrato total do parasito ou com a fração purificada das proteínas (PASSERO *et al.*, 2012a; PASSERO *et al.*, 2012b). Em relação à LV, experimentos de imunização com uma vacina licenciada para o uso em cães, Leishmune[®], constituída por uma subunidade do parasito: uma fração glicoprotéica purificada (FML-ligante fucose manose), obtida do extrato inativado de formas promastigotas de *L. donovani*, confere altos níveis de proteção e bloqueio da transmissão de parasitos para os insetos vetores (SARAIVA *et al.*, 2006). A resposta imunológica estimulada por essa vacina está relacionada com um padrão Th1, com altos níveis de IFN- γ , NO e IgG2a conferindo proteção contra a LVC (ARAUJO *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2011). Nossos dados, comparados com esses, mostram que a PLHLc pode ser utilizada em posteriores experimentos que objetivem a proteção contra desafio por *L. chagasi*, já que a imunização com essa lectina purificada do parasito foi capaz de estimular uma resposta considerada protetora contra a LV.

O padrão de citocinas produzidos pelas células do baço de animais do grupo PLHLc + AIF foi diferente do encontrado no grupo PLHLc. Houve aumento dos níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por esplenócitos reestimulados em placa com AgLc ou PLHLc, respectivamente, em relação ao grupo controle. Porém a produção de IFN- γ foi menor se comparada com a do grupo PLHLc sob o mesmo estímulo, AgLc. Uma hipótese sobre essa diminuição seria o efeito antagônico que a IL-4 e a IL-10 exercem sobre o IFN- γ , suprimindo a sua produção pelos linfócitos. É importante ressaltar aqui que, apesar da IL-4 ser considerada uma citocina relacionada com a susceptibilidade à leishmaniose, diferentemente do que foi abordado anteriormente outros estudos mostram que a presença dessa citocina é importante para o controle da LV. Camundongos deficientes em IL-4 e infectados com formas promastigotas de *L. donovani* apresentaram um maior parasitismo no fígado quando comparado com o de animais selvagens (SATOSKAR *et al.*, 1995). Um estudo envolvendo o tratamento da LV mostrou que a presença de IL-4 é necessária para os efeitos terapêuticos do fármaco utilizado contra a LV: camundongos deficientes em IL-4 infectados com *L. donovani*

responderam fracamente ao tratamento com o fármaco stibogluconato de sódio (Pentostam) com um aumento do parasitismo em vários tecidos. Esses animais apresentaram uma diminuição dos transcritos de mRNA IFN- γ e dos níveis dessa citocina no soro, mostrando que a IL-4, além de exercer um papel importante no tratamento, também pode estar relacionada com a modulação da produção de IFN- γ (ALEXANDER *et al.*, 2000). Além disso, alguns estudos mostram a importância da IL-4 na proliferação celular em infecção experimental por *L. donovani* e *Plasmodium yoelii* (STAGER *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2002). Nossos dados de fato mostram que, embora exista um aumento de IL-4 na cultura de esplenócitos de camundogos do grupo PLHLc + AIF, foi constatado também um aumento da proliferação celular frente aos dois estímulos utilizados durante os experimentos. O aumento de IL-4 e IL-10 pode estar relacionado com a presença do AIF, porém, no grupo que recebeu esse adjuvante também foi observada produção de IFN- γ , NO e IgG2a. A escolha desse adjuvante para os nossos experimentos foi baseado em resultados de um trabalho recente desenvolvido por um grupo de pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto que trabalha com o desenvolvimento de vacinas para a LVC. O estudo baseou-se na comparação do perfil de citocinas após a imunização com três adjuvantes vacinais: saponina, monofosforil lipídeo A (MPL) e AIF, e os resultados mostraram que o AIF foi capaz de estimular a produção de um padrão misto de citocinas Th1/Th2, com a presença de IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α , se aproximando mais do perfil de citocinas induzido pela saponina, adjuvante utilizado nas vacinas para a LVC citadas anteriormente (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012). Com o AIF obtivemos um padrão misto de resposta Th1/Th2, o que nos faz crer em seu potencial de proteção contra a LV, já que alguns trabalhos que avaliaram vacinas licenciadas contra a LVC mostram que o padrão Th1/Th2 permite que este resultado seja atingido. A imunização de camundongos com um fator de virulência presente nas formas amastigotas de *L. donovani*, proteína A2, que foi utilizada posteriormente para o desenvolvimento da vacina Leish-Tec[®], confere proteção contra infecção com *L. donovani* associada a uma resposta Th1/Th2 (GHOSH *et al.*, 2001).

O IFN- γ atua como componente chave para promover a transcrição da enzima iNOS, responsável pela produção de NO pelos macrófagos, o que resulta no controle da proliferação do parasito por suas ações microbidas (DING *et al.*, 1988). Para avaliar o potencial microbida de macrófagos ativados por IFN- γ nos diferentes grupos imunizados, a produção de NO foi avaliada por intermédio dos níveis de nitrito presente no sobrenadante de culturas de esplenócitos de camundongos imunizados com a PLHLc

associada ou não ao AIF após estímulo com AgLc ou PLHLc. Os resultados dos grupos PLHLc e PLHLc + AIF mostraram um aumento dos níveis de NO após estímulo com AgLc quando comparados com cada grupo não estimulado, porém, quando comparamos os dois grupos estimulados com AgLc entre si, houve uma maior produção de NO no grupo PLHLc. Tais resultados corroboram o que observamos na dosagem de IFN- γ , onde encontramos o mesmo perfil de produção da citocina. Altos níveis de IFN- γ /NO são necessários para eliminar os parasitos que pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (SOONG *et al.*, 2012), sendo esses protozoários mais resistentes à ação microbicida do óxido nítrico quando comparado com os parasitos dos outros complexos. Cães imunizados com proteínas de *L. braziliensis* e saponina (LBSap) e desafiados com *L. chagasi* apresentaram altos níveis de IFN- γ e NO, que levaram à proteção contra a infecção (RESENDE *et al.*, 2013). Considerando que os níveis de IFN- γ /NO estão diretamente relacionados com o controle da proliferação do parasito (PANARO *et al.*, 2001), os resultados observados pela imunização com PLHLc podem apresentar uma resposta positiva no controle do parasitismo por *Leishmania*, visto que a produção de IFN- γ e NO foi observada nos dois grupos avaliados: PLHLc e PLHLc + AIF.

Os isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a são bastante utilizados como marcadores de resposta Th1 ou Th2 em camundongos. A seleção dos isotipos de anticorpos expressos pelos linfócitos B é fortemente influenciada pela presença de citocinas. Trabalhos prévios demonstraram que os níveis de IgG2a são dependentes de IFN- γ , já os níveis de IgG1 são correlacionados com a IL-4 (COFFMAN *et al.*, 1993; HASBOLD *et al.*, 1999). Para avaliar a cinética da produção desses isotipos, foi coletado o sangue para a obtenção de soro dos camundongos nos tempos: T0 (antes da primeira imunização), T1 (15 dias após a primeira imunização), T2 (15 dias após a segunda imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização), conforme descrito na metodologia. Os animais dos grupos PLHLc e PLHLc + AIF apresentaram aumento gradual dos níveis de IgG2a ao longo da imunização, sendo T3 o pico de produção desse anticorpo. Quando avaliamos a produção de IgG1, nossos resultados mostraram que, nos grupos PLHLc e PLHLc + AIF, houve um aumento gradual de IgG1 anti-PLHLc durante a imunização dos animais, também com maior produção em T3. Porém, os níveis de IgG1 foram maiores no grupo que recebeu o adjuvante associado com o imunógeno. Ao correlacionar esses dados com a produção das citocinas IFN- γ e IL-4, observamos proporcionalidade entre os níveis de produção dessas citocinas e os níveis de produção de IgG2a e IgG1 anti-PLHLc, respectivamente. Esses dados confirmam os

dados encontrados na literatura, que relacionam a produção dos isotipos IgG2a e IgG1 com IFN- γ e IL-4, conforme citado anteriormente. Em razão disso, podemos utilizar também a razão IgG1/IgG2a para mensurar a relação Th2/Th1. Ao analisarmos os dados desse gráfico observamos que, em T3, após ter sido concluído todo o protocolo de imunização, para o grupo tratado somente com a PLHLc existe um direcionamento para resposta Th1 quando comparado com o grupo controle e imunizado com a PLHLc associada ao AIF, sendo que esse último apresenta um direcionamento para Th2. Vale ressaltar que, no grupo PLHLc + AIF, houve indução de produção de citocinas tanto do tipo Th1 como Th2, indicando que existe um padrão misto de resposta com tendência para Th2. Na literatura são encontrados tanto trabalhos que relacionam a proteção contra a LV a uma resposta Th1 quanto trabalhos que relacionam essa proteção com o perfil misto Th1/Th2. Um estudo que comparou o perfil de citocinas e NO produzidas por duas vacinas utilizadas contra a LVC, Leishmune[®] e Leishvacin[®], em experimentos de imunização de cães, identificou dois perfis distintos produzidos por cada vacina. A Leishmune[®] induziu aumento dos níveis de IFN- γ e NO, representando um perfil Th1, enquanto a Leishvacin[®] induziu um padrão misto (Th1/Th2), com produção de IFN- γ e IL-4. Porém, ambos imunobiológicos foram capazes de ativar fagócitos e células T CD8⁺ que são importantes na eliminação de parasitos intracelulares como *Leishmania* (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Analisando todos os dados obtidos nesse trabalho, concluímos que foram obtidos duas vias imunológicas distintas induzidas pela imunização com a PLHLc isolada (Th1), e a PLHLc associada com o adjuvante incompleto de Freud (Th1/Th2). Porém, vários trabalhos mostram que a proteção contra LV pode ser obtida a partir de ambas as respostas, conforme citado anteriormente, e nosso imunógeno foi capaz de induzir ambos os perfis de respostas, dependendo da utilização ou não do AIF. Isso nos leva a crer que a PLHLc pode, portanto, levar à proteção contra a LV. Para isso se faz necessário realizar experimentos de proteção com os tratamentos utilizados nesse trabalho, ou, até mesmo utilizar outros adjuvantes, como a saponina ou o MPL, visando avaliar se, com o perfil de citocinas produzidas nesse teste de imunogenicidade, a vacina produzida com PLHLc será capaz de proteger camundongos contra o desafio por *L. chagasi*.

7. Conclusões

- ✓ Houve aumento da proliferação celular de células do baço de camundongos BALB/c imunizados com PLHLc associada ou não com AIF após estímulo *in vitro* com PLHLc e AgLc, o que demonstra o potencial mitogênico específico dessa proteína;
- ✓ No grupo de animais que receberam somente a PLHLc, foi observado aumento na produção de IFN- γ , NO e IL-10 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc ou PLHLc e diminuição da relação IgG1/IgG2a quando comparados com os resultados do grupo controle. Portanto, a imunização somente com a proteína foi capaz de direcionar para uma resposta Th1;
- ✓ No grupo de animais que receberam PLHLc + AIF, foi observado aumento na produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e NO por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc ou PLHLc em relação ao grupo controle. Além disso, a relação IgG1/IgG2a foi maior se comparada com a do grupo PLHLc, o que mostra que a associação do AIF com a PLHLc direciona a resposta para um padrão misto Th1/Th2;
- ✓ Os dois perfis de resposta obtidos: Th1 (grupo imunizado com PLHLc) e Th1/Th2 (grupo imunizado com PLHLc associado ao AIF), nos indicam que ambas as formulações podem levar à proteção contra a LV, de acordo com dados da literatura.

8. Perspectivas de estudo

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram a obtenção de duas vias de resposta imunológica distintas induzidas pela imunização com a PLHLc isolada (Th1), ou associada com AIF (Th1/Th2). Porém, como vários trabalhos na literatura mostram, no caso da LV uma proteção pode ser obtida por ambas as respostas, o que nos mostra que o nosso imunógeno foi capaz de induzir duas respostas que podem levar à proteção contra a LV. Buscando ampliar o entendimento dessas duas respostas imunes obtidas pela PLHLc, esse trabalho permite propor as seguintes perspectivas:

- Estudar a eficácia vacinal da PLHLc, avaliando o parasitismo no baço e no fígado, bem como o padrão de citocinas, NO e isotipos de anticorpos IgG1/IgG2a após a infecção de camundongos BALB/c com *L. chagasi*;
- Avaliar a linfoproliferação e o fenótipo de esplenócitos de camundongos BALB/c por citometria de fluxo após o desafio com *L. chagasi* para verificar uma possível resposta de memória duradoura;
- Avaliar imunogenicidade e proteção conferidas pela PLHLc na presença de outros adjuvantes como a saponina ou o MPL, e por outras vias de imunização por meio da dosagem de citocinas, NO, IgG1/IgG2a e linfoproliferação.

9. Referências bibliográficas

ABDIAN, N.; GHOLAMI, E.; ZAHEDIFARD, F.; SAFAEE, N.; RAFATI, S. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v.127, p.627-636, 2011.

ALEXANDER, J.; CARTER, K. C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.30, p.2935-2943, 2000.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, B. M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, p.e35671, 2012.

ANDRADE, A. F.; SARAIVA, E. M. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitol Res**, v.85, p.576-581, 1999.

ARAÚJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; MAGALHAES, C. P.; CARVALHO, A. T.; ANDRADE, M. C.; CAMPOLINA, S. S.; MELLO, M. N.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; MALAQUIAS, L. C.; ROCHA, L. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.141, p.64-75, 2011.

ARAÚJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M. C.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; MALAQUIAS, L. C.; MELLO, M. N.; MARTINS-FILHO, O. A. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. **Vaccine**, v.27, p.1008-1017, 2009.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v.119, p.238-258, 2004.

AZEVEDO, E.; OLIVEIRA, L. T.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DUTRA, P. M.; SALERNO, V. P. Interactions between *Leishmania braziliensis* and Macrophages Are Dependent on the Cytoskeleton and Myosin Va. **J Parasitol Res**, v.2012, p.275436, 2012.

BAMBINO-MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, F. O.; CALVET, C. M.; VICENTE, D.; TOMA, L.; KRIEGER, M. A.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. **Parasitology**, v.138, p.593-601, 2011.

BARATA, R. A.; PEIXOTO, J. C.; TANURE, A.; GOMES, M. E.; APOLINARIO, E. C.; BODEVAN, E. C.; DE ARAUJO, H. S.; DIAS, E. S.; PINHEIRO, A. C. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Res Int**, v.2013, p.405083, 2013.

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; SIMOES, T. C.; NASCIMENTO, B. W.; DA SILVA, E. S.; STRUCHINER, C. J. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, p.e2182, 2013.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.46, p.128-134, 2013.

BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; BAUER, F. S.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; MORGADO, A. A.; SOARES, I. S.; BATISTA, L. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v.26, p.4991-4997, 2008.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol**, v.155, p.3102-3111, 1995.

BUTCHER, B. A.; SKLAR, L. A.; SEAMER, L. C.; GLEW, R. H. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. **J Immunol**, v.148, p.2879-2886, 1992.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, I. F.; BENSINGER, S. J.; GROGL, M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Exp Parasitol**, v.84, p.400-409, 1996.

CANO-MANCERA, R.; LOPEZ-REVILLA, R. Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. **Parasitol Res**, v.74, p.18-22, 1987.

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**, v.8, p.166-170, 2002.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **J Exp Med**, v.147, p.515-530, 1978.

CIFANI, C.; COSTANTINO, S.; MASSI, M.; BERRINO, L. Commercially available lipid formulations of amphotericin b: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? **Acta Biomed**, v.83, p.154-163, 2012.

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

COTA, G. F.; DE SOUSA, M. R.; FEREGUETTI, T. O.; RABELLO, A. Efficacy of anti-*leishmania* therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, p.e2195, 2013.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G., JR.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**, v.50, p.296-311, 1994.

DE CASTRO CORTES, L. M.; DE SOUZA PEREIRA, M. C.; DA SILVA, F. S.; PEREIRA, B. A.; DE OLIVEIRA JUNIOR, F. O.; DE ARAUJO SOARES, R. O.; BRAZIL, R. P.; TOMA, L.; VICENTE, C. M.; NADER, H. B.; DE FATIMA, M. M.; BELLO, F. J.; ALVES, C. R. Participation of heparin binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) in vitro. **Parasit Vectors**, v.5, p.142, 2012a.

DE CASTRO CORTES, L. M.; DE SOUZA PEREIRA, M. C.; DE, O. F., JR.; CORTE-REAL, S.; DA SILVA, F. S.; PEREIRA, B. A.; DE FATIMA, M. M.; DE MORAES, M. T.; BRAZIL, R. P.; ALVES, C. R. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. **Parasitology**, v.139, p.200-207, 2012b.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, v.141, p.2407-2412, 1988.

DOSTALOVA, A.; VOLFF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**, v.5, p.276, 2012.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**, v.26, p.58-85, 2013.

FERNANDES, A. P.; CANAVACI, A. M.; MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. A2 and other visceralizing proteins of *Leishmania*: role in pathogenesis and application for vaccine development. **Subcell Biochem**, v.74, p.77-101, 2014a.

FERNANDES, C. B.; JUNIOR, J. T.; DE, J. C.; SOUZA, B. M.; LARANGEIRA, D. F.; FRAGA, D. B.; TAVARES VERAS, P. S.; BARROUIN-MELO, S. M. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas:

IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v.32, p.1287-1295, 2014b.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**, v.92, p.324-329, 1993.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v.20, p.59-66, 2001.

GHOSHAL, A.; MUKHOPADHYAY, S.; SAHA, B.; MANDAL, C. 9-O-acetylated sialoglycoproteins are important immunomodulators in Indian visceral leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v.16, p.889-898, 2009.

GIUDICE, A.; VENDRAME, C.; BEZERRA, C.; CARVALHO, L. P.; DELAVECHIA, T.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect Dis**, v.12, p.75, 2012.

GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B.; DA SILVEIRA-LEMOES, D.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; BETHONY, J.; VALE, A. M.; DA SILVA, Q. J.; BUENO, L. L.; FRANCA-SILVA, J. C.; NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W.; FUJIWARA, R. T. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v.85, p.106-112, 2008.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *leishmania* immunity. **Front Immunol**, v.3, p.110, 2012.

GOTO, Y.; BHATIA, A.; RAMAN, V. S.; VIDAL, S. E.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against *L. major* infection. **Vaccine**, v.27, p.2884-2890, 2009.

GOUR, J. K.; KUMAR, V.; SINGH, N.; BAJPAI, S.; PANDEY, H. P.; SINGH, R. K. Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). **Exp Parasitol**, v.132, p.355-361, 2012.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. [Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy]. **Parasitologia**, v.46, p.101-103, 2004.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, p.131-138, 1982.

HASBOLD, J.; HONG, J. S.; KEHRY, M. R.; HODGKIN, P. D. Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a. **J Immunol**, v.163, p.4175-4181, 1999.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. 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**, v.169, p.59-72, 1989.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Hum Vaccin**, v.7, p.1204-1214, 2011.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Front Immunol**, v.4, p.156, 2013.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **Br Med Bull**, v.28, p.44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v.63, p.134-145, 1988.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. **Natl Med J India**, v.7, p.196-200, 1994.

LEWIS, D. H.; PETERS, W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. **Ann Trop Med Parasitol**, v.71, p.295-312, 1977.

LIU, G.; ANDERSON, C.; SCALTRETO, H.; BARBON, J.; KENSIL, C. R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. **Vaccine**, v.20, p.2808-2815, 2002.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J Cell Biol**, v.123, p.759-766, 1993.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265-275, 1951.

MARQUES-DA-SILVA, E. A.; COELHO, E. A.; GOMES, D. C.; VILELA, M. C.; MASIOLI, C. Z.; TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; AFONSO, L. C.; REZENDE, S. A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitol Res**, v.98, p.67-74, 2005.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. S.; RAMOS, A. N., JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS One**, v.9, p.e93770, 2014.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Mol Microbiol**, v.77, p.518-530, 2010.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. **Exp Parasitol**, v.132, p.109-115, 2012.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**, v.9, p.e1003053, 2013a.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; RANASINGHE, S.; MATLASHEWSKI, G. Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.31, p.1420-1425, 2013b.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v.107, p.7-14, 2014.

MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W.; MARRACK, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. **Immunity**, v.27, p.687-690, 2007.

MOHAMMADI, M. R.; ZEINALI, M.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. **Korean J Parasitol**, v.44, p.43-48, 2006.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front Cell Infect Microbiol**, v.2, p.121, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUKKADA, A. J.; MEADE, J. C.; GLASER, T. A.; BONVENTRE, P. F. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. **Science**, v.229, p.1099-1101, 1985.

MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; KIIO, M. N.; ICHAGICHU, J. M.; RIKOI, H.; GICHERU, M. M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **J Biomed Res**, v.27, p.85-102, 2013.

NELMS, K.; KEEGAN, A. D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J. J.; PAUL, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol**, v.17, p.701-738, 1999.

NOAZIN, S.; MODABBER, F.; KHAMESIPOUR, A.; SMITH, P. G.; MOULTON, L. H.; NASSERI, K.; SHARIFI, I.; KHALIL, E. A.; BERNAL, I. D.; ANTUNES, C. M.; KIENY, M. P.; TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. **Vaccine**, v.26, p.6759-6767, 2008.

NTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**, v.2 Suppl 1, p.S1, 2009.

OGAWA, T.; WATANABE, M.; NAGANUMA, T.; MURAMOTO, K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. **J Amino Acids**, v.2011, p.838914, 2011.

OLIVEIRA, F.; JOCHIM, R. C.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitol Int**, v.58, p.1-5, 2009.

OLIVEIRA, F. O., JR.; ALVES, C. R.; CALVET, C. M.; TOMA, L.; BOUCAS, R. I.; NADER, H. B.; CASTRO CORTES, L. M.; KRIEGER, M. A.; MEIRELLES, M. N.; SOUZA PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. **Microb Pathog**, v.44, p.329-338, 2008.

OLIVEIRA, F. O., JR.; ALVES, C. R.; SOUZA-SILVA, F.; CALVET, C. M.; CORTES, L. M.; GONZALEZ, M. S.; TOMA, L.; BOUCAS, R. I.; NADER, H. B.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v.139, p.735-743, 2012.

OLIVEIRA-JR, F. O.; ALVES, C. R.; SILVA, F. S.; CORTES, L. M.; TOMA, L.; BOUCAS, R. I.; AGUILAR, T.; NADER, H. B.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. **Parasitology**, v.140, p.171-180, 2013.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes Infect**, v.14, p.1377-1389, 2012.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; BARBOSA, A. F.; OLIVEIRA, S. M.; NICO, D.; BERNARDO, R. R.; SANTOS, W. R.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I.; BORJA-CABRERA, G. P. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v.7, p.833-851, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A. A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v.27, p.3505-3512, 2009.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.24, p.187-195, 2001.

PASSERO, L. F.; CARVALHO, A. K.; BORDON, M. L.; BONFIM-MELO, A.; CARVALHO, K.; KALLAS, E. G.; SANTOS, B. B.; TOYAMA, M. H.; PAES-LEME, A.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Proteins of *Leishmania (Viannia) shawi* confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. **Parasit Vectors**, v.5, p.64, 2012a.

PASSERO, L. F.; CARVALHO, A. K.; BORDON, M. L.; BONFIM-MELO, A.; TOYAMA, M. H.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. *Leishmania (Viannia) shawi* purified antigens confer protection against murine cutaneous leishmaniasis. **Inflamm Res**, v.61, p.255-263, 2012b.

PIPIROU, Z.; POWLESLAND, A. S.; STEFFEN, I.; POHLMANN, S.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. Mouse LSECtin as a model for a human Ebola virus receptor. **Glycobiology**, v.21, p.806-812, 2011.

PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes

Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, p.561-566, 2011.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol**, v.6, p.147-154, 2014.

RESENDE, L. A.; ROATT, B. M.; GUIAR-SOARES, R. D.; VIANA, K. F.; MENDONCA, L. Z.; LANNA, M. F.; SILVEIRA-LEMOS, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; FUJIWARA, R. T.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C. Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. **Vet Parasitol**, v.198, p.371-381, 2013.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v.2, p.59, 2012.

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

ROATT, B. M.; GUIAR-SOARES, R. D.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol**, v.5, p.272, 2014.

ROATT, B. M.; GUIAR-SOARES, R. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DE, L. M.; FIGUEIREDO, G. N.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. **PLoS One**, v.7, p.e49780, 2012.

RODRIGUEZ, N. E.; GAUR, D. U.; ALLEN, L. A.; WILSON, M. E. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. **PLoS One**, v.6, p.e19000, 2011.

RODRIGUEZ, N. E.; GAUR, U.; WILSON, M. E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cell Microbiol**, v.8, p.1106-1120, 2006.

SAFFER, L. D.; PETRI, W. A., JR. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect Immun**, v.59, p.4681-4683, 1991.

SANTOS, W. R.; AGUIAR, I. A.; PARAGUAI DE, S. E.; DE, L., V; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v.21, p.4668-4676, 2003.

SARAIVA, E. M.; DE FIGUEIREDO, B. A.; SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; NICO, D.; SOUZA, L. O.; DE, O. M.-A.; DE SOUZA, E. P.; FAMPA, P.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; DIAS, J. G., JR.; DE OLIVEIRA, S. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, v.24, p.2423-2431, 2006.

SATOSKAR, A.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. **Infect Immun**, v.63, p.4894-4899, 1995.

SHAH, S.; SHAH, A.; PRAJAPATI, S.; BILIMORIA, F. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in HIV-positive patients: A study of two cases. **Indian J Sex Transm Dis**, v.31, p.42-44, 2010.

SHIMIZU, Y.; YAMAKAMI, K.; GOMI, T.; NAKATA, M.; ASANUMA, H.; TADAKUMA, T.; KOJIMA, N. Protection against *Leishmania* major infection by oligomannose-coated liposomes. **Bioorg Med Chem**, v.11, p.1191-1195, 2003.

SINGH, O. P.; STOBER, C. B.; SINGH, A. K.; BLACKWELL, J. M.; SUNDAR, S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, p.e1874, 2012.

SINGH, R. S.; THAKUR, S. R.; BANSAL, P. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Crit Rev Microbiol** 2013.

SMITH, D. F.; RANGARAJAN, D. Cell surface components of *Leishmania*: identification of a novel parasite lectin? **Glycobiology**, v.5, p.161-166, 1995.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v.34, p.735-751, 2012.

SRIVASTAVA, S.; PANDEY, S. P.; JHA, M. K.; CHANDEL, H. S.; SAHA, B. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clin Exp Immunol**, v.172, p.403-409, 2013.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; KIRBY, A. C.; BOTTO, M.; ROOIJEN, N. V.; SMITH, D. F.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8⁺ T-cell responses. **Nat Med**, v.9, p.1287-1292, 2003.

STOBER, C. B.; LANGE, U. G.; ROBERTS, M. T.; ALCAMI, A.; BLACKWELL, J. M. IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.175, p.2517-2524, 2005.

SVOBODOVA, M.; BATES, P. A.; VOLF, P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Acta Trop**, v.68, p.23-35, 1997.

TAYLOR, C. E. Cytokines as adjuvants for vaccines: antigen-specific responses differ from polyclonal responses. **Infect Immun**, v.63, p.3241-3244, 1995.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, v.52, p.287-292, 1995.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v.239, p.1306-1308, 1988.

VAN, D., V; PLANTINGA, T. S.; DONNELLY, J. P.; KULLBERG, B. J.; BLIJLEVENS, N. M.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. **Virulence**, v.1, p.180-184, 2010.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES RD; SIQUEIRA-MATHIAS, F. A.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; GIUNCHETTI, R. C.; DE SA, R. G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. **Mol Immunol**, v.56, p.540-548, 2013.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARNEIRO, C. M.; SIQUEIRA, F. A.; VIEIRA, P. M.; GIUNCHETTI, R. C.; MOURA, S. A.; FUJIWARA, R. T.; MELO, M. N.; REIS, A. B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. **PLoS One**, v.7, p.e40745, 2012.

VITORIANO-SOUZA, J.; REIS, A. B.; MOREIRA, N. D.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. **Vaccine**, v.26, p.3922-3931, 2008.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.345, p.223-230, 1994.

ZEVEDO-PEREIRA, R. L.; PEREIRA, M. C.; OLIVERIA-JUNIOR, F. O.; BRAZIL, R. P.; CORTES, L. M.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, A. L.; TOMA, L.; ALVES, C. R.

Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Vet Parasitol**, v.145, p.234-239, 2007.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. **Mol Microbiol**, v.39, p.935-948, 2001.

ZINCHUK, A.; NADRAGA, A. Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: case report. **Ann Trop Paediatr**, v.30, p.161-164, 2010.