

SABRINA DE OLIVEIRA EMERICK

**Avaliação da proteção conferida a camundongos BALB/c contra
Leishmania infantum chagasi após imunização com proteína ligante de
heparina do parasito (PLHLc)**

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
2016

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

T

E53a
2016 Emerick, Sabrina de Oliveira, 1985-
Avaliação da proteção conferida a camundongos BALB/c
contra *Leishmania infantum chagasi* após imunização com
proteína ligante de heparina do parasito (PLHLc) / Sabrina de
Oliveira Emerick. - Viçosa, MG, 2016.
xv, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.55-67.

1. *Leishmania infantum chagasi*. 2. Leishmaniose.
3. Heparina. 4. Imunização. I. Universidade Federal de Viçosa.
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.

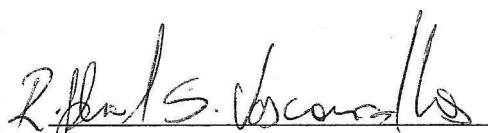
CDD 22 ed. 614.53

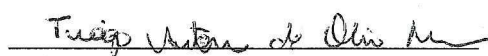
SABRINA DE OLIVEIRA EMERICK

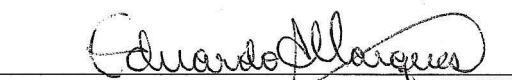
**Avaliação da proteção conferida a camundongos BALB/c contra
Leishmania infantum chagasi após imunização com proteína ligante
de heparina do parasito (PLHLc)**

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: 22 de Agosto de 2016.


Raphael de Souza Vasconcellos


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

“O que faz andar a estrada? É o sonho. Enquanto a gente sonhar a estrada permanecerá viva. É para isso que servem os caminhos, para nos fazerem parentes do futuro.”

(Fala de Tuahir)

Mia Couto; Terra Sonâmbula

Agradecimentos

Graças ao meu Pai amoroso, Deus fiel e Menino, pela caminhada, fé, sustento e onipresente companhia!

Sincero agradecimento os meus amados pais Elcio e Celma, pela força, orações, valores ensinados, presença constante e tão carinhosa!

Aos meus companheiros de vida, meus queridos irmãos Elciana, Tatiana e Raphael e meus primos Ruslan e Talita. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Fabrícia e Pedro por deixarem minha vida muito mais alegre!

Ao Eduardo pela disponibilidade em me orientar e por estar sempre tão disposto a ensinar. Agradeço imensamente a confiança, motivação, amizade e principalmente por fazer parte do meu crescimento científico e profissional!

Ao Leandro por toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e por ser sempre tão solícito!

Aos professores Sérgio de Paula e Juliana Fietto pelo consentimento para a utilização dos seus laboratórios. Muito obrigado!

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

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela imensa oportunidade de formação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM da UFV.

Aos professores da Pós-graduação, em especial àqueles que participaram do meu processo de formação.

Aos professores convidados para compor a banca, muito obrigado!

Às minhas companheiras de trabalho e pesquisa Thaís, Adriana, Bianca e Amanda pelos aprendizados compartilhados e por toda ajuda e empenho nos experimentos.

À todos que fazem parte do Laboratório de Glicobiologia e Imunoparasitologia pela agradável e deliciosa convivência. Ao Patrick, Wendel, Alessandra, Cris e Thaís meu agradecimento pelos auxílios e ensinamentos.

Aos queridos parceiros do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, pela acolhida, confiança, troca de experiências e tão agradável convivência.

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

À Luciane Portugal, minha sempre professora, coordenadora e amiga, pela confiança, oportunidades e incentivos imprescindíveis para a chegada até aqui.

Aos demais mestres, aos companheiros de trabalho da Escola do Futuro e Faculdade do Futuro e aos meus queridos e eternos alunos pelo incentivo e votos de sucesso!

Aos amigos tão queridos que Viçosa e a UFV me presentearam.

Aos amigos e familiares que mesmo longe se fazem tão presentes em minha vida!

Aos meus poetas por dar-me a leveza de suas companhias!

Índice

Lista de figuras.....	viii
Lista de siglas.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
<i>2.1 Leishmanioses: agentes etiológicos e taxonomia.....</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Transmissão e ciclo biológico de Leishmania infantum chagasi.....</i>	<i>6</i>
<i>2.3 Manifestações clínicas.....</i>	<i>10</i>
<i>2.4 Epidemiologia da LV.....</i>	<i>12</i>
<i>2.5 Resposta imunológica na LV.....</i>	<i>15</i>
<i>2.6 Tratamento e vacinas para LV.....</i>	<i>18</i>
<i>2.7 Lectinas e sua utilização como imunógeno.....</i>	<i>23</i>
3. Objetivos.....	26
<i>3.1 Objetivo geral.....</i>	<i>26</i>
<i>3.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>26</i>
4. Delineamento experimental.....	27
5. Material e métodos.....	28
<i>5.1 Animal experimental.....</i>	<i>28</i>
<i>5.2 Obtenção de parasitos.....</i>	<i>28</i>

5.3	<i>Cultura dos parasitos para obtenção de extrato proteico solúvel.....</i>	29
5.4	<i>Obtenção de antígeno particulado de <i>L. infantum chagasi</i>.....</i>	29
5.5	<i>Purificação de PLHLc do extrato parasitário.....</i>	30
5.6	<i>Dosagem de PLHLc e AgLc.....</i>	30
5.7	<i>Análise eletroforética de PLHLc.....</i>	30
5.8	<i>Experimentos de imunização.....</i>	31
5.9	<i>Infecção de camundongos.....</i>	31
5.10	<i>Eutanásia.....</i>	32
5.11	<i>Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado.....</i>	32
5.12	<i>Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas e óxido nítrico.....</i>	33
5.13	<i>Dosagem de óxido nítrico.....</i>	33
5.14	<i>Dosagem de citocinas.....</i>	34
5.15	<i>Análise estatística.....</i>	34
6.	Resultados.....	35
6.1	<i>Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos BALB/c imunizados com PLHLc.....</i>	35
6.2	<i>Avaliação da produção de citocinas (IFN-γ, TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) produzidas por esplenócitos estimulados com AgLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc.....</i>	36
6.2.1	<i>Produção de IFN-γ.....</i>	37
6.2.2	<i>Produção de TNF.....</i>	37
6.2.3	<i>Produção de IL-2.....</i>	38

<i>6.2.4 Produção de IL-17.....</i>	<i>39</i>
<i>6.2.5 Produção de IL-6.....</i>	<i>40</i>
<i>6.2.6 Produção de IL-10.....</i>	<i>41</i>
<i>6.2.7 Produção de IL-4.....</i>	<i>42</i>
<i>6.3 Avaliação da Produção de NO por esplenócitos estimulados com AgLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc.....</i>	<i>42</i>
7. Discussão.....	44
8. Conclusões.....	51
9. Perspectivas de estudo.....	53
10. Considerações finais.....	55
11. Referências bibliográficas.....	53

Lista de figuras

Figura 1: Morfologia de <i>Leishmania</i> sp.....	4
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum chagasi</i>.....	9
Figura 3: Manifestações clínicas das leishmanioses.....	12
Figura 4: Quantificação da carga parasitária do baço de camundongos BALB/c imunizados.....	35
Figura 5: Quantificação da carga parasitária do fígado de camundongos BALB/c imunizados.....	36
Figura 6: Produção de IFN-γ por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	37
Figura 7: Produção de TNF por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	38
Figura 8: Produção de IL-2 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	39
Figura 9: Produção de IL-17 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	40
Figura 10: Produção de IL-6 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	41
Figura 11: Produção de IL-10 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	42
Figura 12: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante.....	43

Lista de siglas

AgLc- Antígeno Particulado de *Leishmania infantum chagasi*

AIF- Adjuvante Incompleto de Freund

BCA- Ácido Bicinconínico

DCs- Células Dendríticas

DTNs- Doenças Tropicais Negligenciadas

FML- Ligante de Manose-Fucose

GAGs- Glicosaminoglicanas

G-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

IFN- γ - Interferon Gama

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-17- Interleucina 17

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-2- Interleucina 2

IL-21- Interleucina 21

IL-22- Interleucina 22

IL-23- Interleucina 23

IL-3- Interleucina 3

IL-4- Interleucina 4

IL-5 Interleucina 5

IL-6- Interleucina 6

iNOS- NO Sintetase Induzível

KCs- Células de Kupffer

kDNA- DNA mitocondrial

KMP-11- Proteína 11 da Membrana do Cinetoplasto

LCD- Leishmaniose Cutânea Difusa

LDPK- Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar

LMC- Leishmaniose Mucocutânea

LPG- Lipofosfoglicano

LT α - Linfotoxina Alfa

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

LVH- Leishmaniose Visceral Humana

MAC- Complexo de Ataque a Membrana

MHC- Complexo Principal de Histocompatibilidade

MZ- Zona Marginal

NK- Célula *Natural Killer*

NO- Óxido Nítrico

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAMP- Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS- Salina Tamponada com Fosfato

PLH- Proteína Ligante de Heparina

PLHLc- Proteína Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*

PO- Proteína Ribossomal

PRRs- Receptores de Reconhecimento Padrão

PVCLV- Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RP- Polpa Vermelha

rPLHLc- Proteína Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*
Recombinante

SAP- Saponina

SFB- Soro Fetal Bovino

SLA- Antígeno Solúvel de *Leishmania*

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento-Beta

TLRs- Receptores Semelhantes a Toll

TNF- Fator de Necrose Tumoral

WP- Polpa Branca

Resumo

EMERICK, Sabrina de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Avaliação da proteção conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania infantum chagasi* após imunização com proteína ligante de heparina do parasito (PLHLc)**. Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários parasitas intracelulares da espécie *Leishmania infantum chagasi* nas Américas. Esses parasitos possuem forte tropismo por órgãos viscerais, especialmente baço, fígado e medula óssea, onde se proliferam e provocam lesões podendo ser letal caso não sejam tratadas. O parasito possui moléculas consideradas fatores de virulência que vem sendo intensamente investigadas. Entre elas destacamos as proteínas ligante de heparina (PLH), glicoproteínas relacionadas em diversos trabalhos na literatura com o processo de adesão e internalização do parasito à célula hospedeira. Nesse trabalho utilizamos a PLH de *L. infantum chagasi* (PLHLc) em experimentos de imunização de camundongos BALB/c para avaliar a proteção conferida a esses animais após desafio com as formas promastigotas do parasito. Foram avaliadas a carga de parasitos no baço e no fígado, produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) e de óxido nítrico (NO) após imunização com PLHLc isolada ou associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Adjuvante Saponina (SAP), quatro semana após o desafio. Os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal ou subcutânea, sendo submetidos a duas doses de reforço utilizando o mesmo protocolo da primeira imunização. Quinze dias após a última dose os camundongos foram infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum chagasi* em fase final logarítmica de crescimento. Quatro semanas após a infecção os animais foram eutanasiados e o baço e o fígado foram coletados para ensaio da quantificação da carga parasitária e avaliação da produção de citocinas e NO por citometria de fluxo e pelo método de Griess, respectivamente. Nossos resultados mostraram que o grupo imunizado apenas com PLHLc não apresentou redução da carga parasitária e os esplenócitos estimulados *in vitro* com antígeno particulado de *L. infantum chagasi* (AgLc) produziram citocinas IL-6 e IL-17, ambas de padrão de resposta imune Th17 e a citocina IL-10. O grupo imunizado com PLHLc + AIF apresentou redução da

carga de parasitos apenas no baço e produziram citocinas IFN- γ e IL-2 (Th1), IL-6 e IL-17 (Th17) e IL-10. O grupo imunizado com PLHLC + SAP apresentou redução da carga parasitária no baço e no fígado. Os esplenócitos desse grupo estimulados *in vitro* com AgLc produziram maiores médias de citocinas de padrão de resposta imune Th1 e Th17 e a citocina reguladora IL-10 comparado com os grupos anteriores. Em relação a produção de NO por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc níveis basais foram detectados pelo método de Griess em todos os grupos avaliados. Os resultados alcançados nos mostra que a PLHLC associada ao adjuvante Saponina representa uma forte candidata a vacina contra LV e nos direciona para uma nova etapa de investigação, a proteção conferida pela PLHLC recombinante.

Abstract

EMERICK, Sabrina de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Evaluation of protection given to BALB/c mice against *Leishmania infantum chagasi* after immunization with heparin-binding protein of the parasite (HBPLc)**. Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Co-adviser: Leandro Licursi de Oliveira.

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by the protozoan intracellular parasite *Leishmania infantum chagasi* specie in the Americas. These parasites exhibit a strong tendency to invade visceral organs, especially the spleen, liver and bone marrow, where they proliferate and cause injuries and can be lethal if not treated. The parasite exhibit molecules considered as virulence factors that have been intensively searched. Among then we highlight the heparin-binding proteins (HBP), glycoproteins related in several studies in the literature with the process of adhesion and internalization of the parasite to the host cell. In this work, we used *L. infantum chagasi* HBP (HBPLc) in immunization experiments using BALB/c mice to evaluate the protection given to the animals after challenge with promastigote forms of the parasite. Were evaluate the parasite load in the spleen and liver, cytokine production (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) and nitric oxide (NO) after immunization with isolated HBPLc or associated with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) and Saponin Adjuvant (SAP), four weeks after challenge. The mice were immunized by intraperitoneal or subcutaneous route and submitted two times to booster doses using the same protocol of the first immunization. Fifteen days after the last dose the mice were infected with 1×10^7 *L. infantum chagasi* promastigotes end logarithmic phase of growth. Four weeks after infection the animals were euthanized and spleen and liver were collected for assay quantification of the parasite load and evaluation of the cytokine and NO production by flow cytometry and by Griess method, respectively. Our results showed that the group immunized with only HBPLc showed no reduction in parasite load and spleen cells stimulated *in vitro* with crude extract of *L. infantum chagasi* (AgLc) produced cytokines IL-6 and IL-17, both standard immune response Th17 and IL-10 cytokine. The group immunized with HBPLc + IFA decreased the parasite load only in the spleen and produced cytokines IFN- γ and IL-2 (Th1), IL-6 and IL-17 (Th17) and IL-10 cytokine. The group

immunized with HBPLc + SAP decreased the parasite load in the spleen and liver. The spleen cells this group *in vitro* stimulated with AgLc generated pattern cytokines of Th1 and Th17 and regulatory cytokine IL-10 compared to previous groups. About NO production by spleen cells stimulated *in vitro* with AgLc baseline levels were detected by Griess method in all groups evaluated. The results achieved shows that the HBPLc associated with Saponin adjuvant is a strong candidate against VL vaccine and directs us to a new stage of research, the protection given by recombinant HBPLc.

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde as leishmanioses estão inseridas na categoria de Doenças Tropicais Negligenciadas e têm como agentes infecciosos espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, um parasito intracelular obrigatório que infecta humanos e outras espécies de mamíferos (WHO, 2010). Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos que, ao realizarem o repasto sanguíneo, introduzem o parasito em hospedeiros mamíferos como o cão e o homem (AKHOUNDI et al., 2016b). As doenças decorrentes da infecção apresentam formas clínicas bem distintas, que variam de lesões cutâneas a acometimento visceral, o que depende da espécie do parasito. A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais severa da doença, decorrente de lesões viscerais graves no fígado, baço e medula óssea, que pode evoluir para óbito caso não seja tratada (KEVRIC et al., 2015).

A LV tem como agentes etiológicos as espécies *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. infantum chagasi* no Novo Mundo (BIFELD; CLOS, 2015). Segundo estimativas, aproximadamente 300.000 casos de LV ocorrem anualmente em todo o mundo, sendo que destes, mais de 20.000 são fatais. Em escala mundial, o Brasil é um dos 6 países com mais casos de LV e o país com maior índice da doença na América Latina (WHO, 2016; LARA-SILVA et al., 2015). Inúmeras pesquisas realizadas ao longo dos anos nos têm fornecido muitas informações sobre a biologia de *Leishmania*, porém ainda não existem medicamentos que sejam altamente eficazes e seguros no tratamento da leishmaniose ou vacinas licenciadas para uso em humanos. O tratamento tem sido limitado à utilização de quimioterápicos, no entanto, os fármacos de primeira linha utilizados, além de provocar sérios efeitos colaterais, têm aumentado a resistência dos parasitos. A vacina representa uma promissora e importante estratégia profilática que, além de fornecer uma proteção em longo prazo, pode também reduzir a transmissão da doença (BIFELD; CLOS, 2015; NO, 2016; DUTHIE et al., 2016; GILLESPIE et al., 2016).

Diversas moléculas importantes para a virulência de *Leishmania* têm sido investigadas como imunógenos para a formulação de vacinas (BHOWMICK et al., 2008; SINHA et al., 2011; DE MENDONÇA et al., 2015; MORENO et al., 2012) e as

proteínas ligantes de heparina podem ser candidatas promissoras, uma vez que essas moléculas participam de processos de adesão e internalização do parasito em células hospedeiras (AZEVEDO-PEREIRA et al., 2007; DE CASTRO CÔRTEZ et al., 2012b; MARTINS et al., 2015). Experimentos realizados em nosso laboratório resultaram na purificação e caracterização de proteína ligante de heparina de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* (PLHLc) (MARTINS et al., 2015) e esta proteína, em sua forma nativa, se mostrou imunogênica e indutora de resposta mista Th1/Th2 em imunização de camundongos BALB/c com PLHLc associada ao Adjuvante Incompleto de Freund (dados não publicados). Os resultados alcançados nos levam a investigar o potencial protetor da PLHLc em experimentos de imunização contra *L. infantum chagasi* em hospedeiros mamíferos e, ainda, avaliar essa formulação vacinal como candidata ao controle da forma visceral da leishmaniose em mamíferos, sejam eles humanos ou outros animais como o cão, importante reservatório da doença nos ambientes urbanos.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Leishmanioses: agentes etiológicos e taxonomia*

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças negligenciadas cujos agentes infecciosos pertencem ao reino Protista, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. As espécies desse gênero apresentam ciclo de vida digenético, alterando entre duas formas evolutivas principais: as formas promastigotas alongadas, móveis e flageladas, presentes no tubo digestivo de insetos flebotomíneos e as formas amastigotas imóveis, com morfologia arredondada que parasitam células do Sistema Fagocitário Mononuclear de mamíferos (UL BARI; RAHMAN, 2008; AKHOUNDI et al., 2016). As formas promastigotas ou flagelares medem de 10-15 μm de comprimento e possuem um único e longo flagelo anterior, que além de fornecer motilidade, permite a fixação no intestino do inseto flebotomíneo. Essa forma do parasito é responsável pela infecção dos insetos vetores e dos hospedeiros vertebrados, sendo encontradas no intestino de insetos flebotomíneos e em meios de culturas formando aglomerados ou rosetas – Figura 1B. As formas amastigotas são ovais ou redondas e medem cerca de 2-5 μm . Possuem um núcleo centralizado anterior ao cinetoplasto e mitocôndria única rica em DNA mitocondrial (kDNA). Ambas as organelas podem ser facilmente visualizadas na microscopia óptica por coloração de rotina hematoxilina-eosina. As formas amastigotas apresentam um curto flagelo sem motilidade aparente, mas que possivelmente desempenha um importante papel na organização e/ou na percepção celular. Essa forma do parasito é responsável pela propagação e manutenção da patologia no hospedeiro mamífero - Figura 1A (UL BARI; RAHMAN, 2008; GLUENZ et al., 2010; FREITAS et al., 2012).

Cerca de 53 espécies de *Leishmania* já foram descritas. Destas, 31 espécies são conhecidas por parasitarem mamíferos e 20 espécies são patógenas para o homem. As espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos apresentam distribuição mundial. Elas estão presentes em áreas tropicais e subtropicais incluindo as Américas, bacia do Mediterrâneo, Sudeste da Europa, Oriente Médio, Sudeste da Ásia, subcontinente indiano, África e Austrália (AKHOUNDI et al., 2016a).

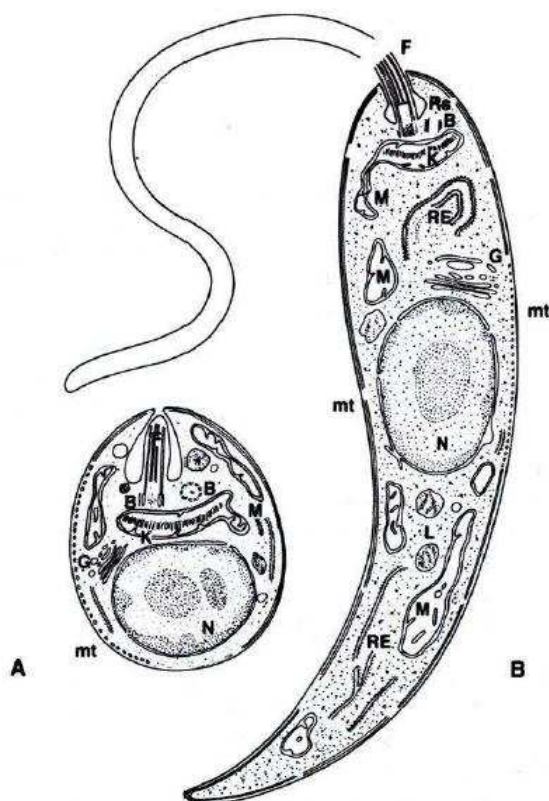


Figura 1: Morfologia de *Leishmania* sp. Figura esquemática mostrando a forma amastigota (A), a forma promastigota (B) e suas organelas: núcleo (N), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), flagelo (F), retículo endoplasmático (RE), membrana (mt). Disponível em: Rev, L. Bases da Parasitologia. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

Em 1908 surgiram as primeiras propostas de classificação do protozoário *Leishmania*. Sugerida por Nicolle, a primeira classificação baseava na separação de *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Mediterrâneo e *L. donovani*, agente causador do calazar indiano. Desde então, várias outras tentativas de classificação do protozoário foram propostas. Um marco para a classificação de *Leishmania* foi o sistema apresentado por Lainson e Shaw em 1987. Eles 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, tamanho, local de colonização no intestino do inseto vetor, distribuição geográfica e características diferenciais como sorotipagem e perfil enzimático (AKHOUNDI et al., 2016; LAINSON; SHAW, 1987).

O subgênero *Viannia* inclui os parasitos que pertencem ao complexo “*Leishmania braziliensis*” e agrupam espécies como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. 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, 1987).

Os protozoários que pertencem ao subgênero *Leishmania* estão classificados em dois complexos denominados “*Leishmania mexicana*” e “*Leishmania donovani*”. Os protozoários de ambos os complexos se desenvolvem no intestino anterior e médio do inseto vetor, mas se diferenciam em relação ao tamanho da forma intracelular do parasito e em relação às lesões provocadas em seus hospedeiros vertebrados. Os parasitos que pertencem ao complexo *Leishmania mexicana* apresentam formas amastigotas pequenas, e as lesões causadas no homem por esses protozoários se restringem à pele, sendo consideradas benignas. Pertencem a esse complexo as seguintes espécies: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* e *Leishmania (Leishmania) pifanoi*. No complexo *Leishmania donovani* estão presentes as espécies responsáveis pela forma mais grave e letal da leishmaniose, a LV, uma vez que possuem um forte tropismo a invadir e disseminar nas vísceras. Pertencem a esse complexo as seguintes espécies: *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 (LAINSON; SHAW, 1988; CUPOLILLO et al., 1994).

Um dilema taxonômico em relação ao nome usado para se referir ao parasito causador da LV humana e canina nas Américas tem provocado um impasse há alguns anos. Podemos citar como exemplo algumas diferentes nomenclaturas encontradas em publicações nos últimos dois anos: *Leishmania infantum* (COSTA et al., 2014), *Leishmania chagasi* (MARTINS et al., 2015), *Leishmania (infantum) chagasi* (LEAL et al., 2015), *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014) e *Leishmania infantum chagasi* (TORRES et al., 2015). Em uma recente revisão sobre o histórico de classificação, evolução e dispersão do parasito *Leishmania* e seus vetores, *Leishmania chagasi* aparece como sinônimo de

Leishmania infantum (AKHOUNDI et al., 2016a). Em 2006, Dantas-Torres publicou uma interessante nota sugerindo um reestabelecimento dos critérios usados para a classificação desse agente etiológico com base nos critérios tradicionais propostos por Lainson e Shaw em 1987 e dados moleculares recentes. Uma questão levantada foi o “status” de espécie ou subespécie de um dado parasito. Para isso recorreu à definição de subespécie proposta por Lainson e Shaw no primeiro capítulo do livro “As Leishmanioses na Biologia e Medicina” de 1987. Neste livro, o termo subespécie aparece definido como “populações locais, geograficamente isoladas que apresentam algumas (geralmente pequenas) diferenças taxonômicas de outras populações geograficamente separadas da mesma espécie”. Sendo assim, segundo o autor, torna-se aceitável a classificação do agente etiológico da LV nas Américas como *Leishmania infantum chagasi* (DANTAS-TORRES, 2006). Interessado na discussão iniciada por Dantas-Torres, Shaw também publicou uma nota, no mesmo ano, onde se mostrou concordar com a nomenclatura sugerida, mas levantou uma segunda questão: o nome *chagasi* pode ser usado como sinônimo de *infantum*? Levar isso em conta significa dizer que os dois parasitos são idênticos, mas evidências moleculares têm demonstrado diferenças entre os dois. Como ainda existem muitas questões em relação à origem, identidade e epidemiologia do agente etiológico da LV, segundo o autor, torna-se mais prudente continuar utilizando a nomenclatura sugerida por Dantas-Torres (SHAW, 2006). Em discussões realizadas pelo nosso grupo de pesquisa também optamos por fazer uso da nomenclatura *Leishmania infantum chagasi* para nos referir ao agente infeccioso da LV nas Américas.

2.2 Transmissão e ciclo biológico de *Leishmania infantum chagasi*

Leishmaniose é uma doença vetorial e a transmissão do protozoário *Leishmania* ao hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos (Ordem: Diptera; Família: Psychodidae; Subfamília: Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. As espécies do gênero *Lutzomyia* são encontradas apenas na região tropical do Novo Mundo, especialmente nas áreas florestais da América Central e do Sul (AKHOUNDI et al., 2016b; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Estes insetos são pequenos,

medindo cerca de 1,5 a 3 mm de comprimento. O corpo é revestido de pelos e possuem coloração castanho claro ou cor de palha, sendo popularmente conhecidos no Brasil como mosquito-palha ou birigui (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA, 2006). A espécie *Lu. longipalpis* é o principal vetor no Novo Mundo, mas a transmissão também pode ocorrer por *Lu. cruzi* e *Lu. evansi* (BELO et al., 2013; VIANNA et al., 2016). Em um recente estudo realizado em Fortaleza, capital do Ceará, foi identificada *Lu. migonei* naturalmente infectada com *L. infantum chagasi*, com confirmação a nível molecular da ação potencial dessa espécie como vetor (RODRIGUES et al., 2016a). Outros casos menos frequentes e comuns de transmissão de leishmaniose já foram registrados, como a transmissão congênita, por transfusão de sangue e por agulhas contaminadas compartilhadas por usuários de droga (BELO et al., 2013).

Leishmania sp. apresenta um ciclo biológico heteroxênico, alterando-se entre o hospedeiro invertebrado, que atua como vetor da leishmaniose, e o hospedeiro vertebrado, que atua como reservatório do parasito. O *Lu. longipalpis* era inicialmente uma espécie unicamente silvestre e as fêmeas realizavam a hematofagia em animais como raposas, gambás e roedores, ficando o parasito restrito ao ciclo silvestre. No entanto, transformações ambientais decorrentes do desmatamento, da fragmentação de habitat e da crescente expansão das áreas urbanas aproximaram o vetor de outros mamíferos, principalmente o cão e o homem. O cão passou a desempenhar um papel fundamental como reservatório do parasito e como principal fonte de infecção do inseto vetor devido à elevada carga parasitária na pele, favorecendo o ciclo urbano e periurbano da leishmaniose (LAINSON; RANGEL, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA, 2006). Em um estudo realizado em dois distritos de Belo Horizonte, locais com alta prevalência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), 5.194 insetos plebotomíneos foram capturados e destes, 96,5% eram *Lu. longipalpis*, confirmando a plena adaptação dessa espécie aos ambientes urbanos (LARA-SILVA et al., 2015).

O ciclo de *L. infantum chagasi* é relativamente simples, porém envolve um complexo desenvolvimento do parasito no inseto vetor. Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, as fêmeas de flebotomíneos ingerem, juntamente com o sangue, formas amastigotas do parasito, podendo estas estar livres ou dentro de fagócitos. Alterações das condições do ambiente como, diminuição da temperatura e aumento do pH, que se estendem do hospedeiro mamífero ao intestino médio do flebotomíneo, promovem transformações morfológicas e o desenvolvimento

do parasito. No trato intestinal do vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, formas que apresentam um pequeno flagelo na extremidade anterior e pouca motilidade, dando início ao ciclo proliferativo do parasito – Figura 2(1). Após 48 a 72 horas, a taxa de replicação diminui e tem início o processo de metaciclogênese, no qual o parasito sofre uma série de transformações morfológicas e bioquímicas e adquire um perfil infectante, dando origem às chamadas formas promastigotas metacíclicas – Figura 2(2). Neste estágio, o parasito, que já apresenta um longo flagelo anterior, obstrui a válvula estomadeal, o que facilita o refluxo do mesmo ao hospedeiro vertebrado susceptível durante o próximo repasto sanguíneo do vetor. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante a picada de fêmeas de insetos flebotomíneos infectados e introduzidas na epiderme do hospedeiro juntamente com a saliva – Figura 2(3). Na epiderme, essas formas são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear. No interior de macrófagos, induzidos pela temperatura elevada de mamíferos e pelo baixo pH do vacúolo parasitóforo, os parasitos se transformam em formas amastigotas e se multiplicam intensamente – Figura 2(4). Os macrófagos, apesar de serem células fagocitárias especializadas em combater agentes infecciosos, não conseguem impedir a replicação do parasito em seu interior e sofrem lise, liberando formas amastigotas na circulação sanguínea – Figura 2(5). Uma vez livres, as formas amastigotas podem infectar novas células fagocitárias, num contínuo processo, propagando a infecção para outros tecidos ricos em células do Sistema Fagocitário Mononuclear como baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides - Figura 2(6) (NIETO et al., 2011; FREITAS et al., 2012; DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

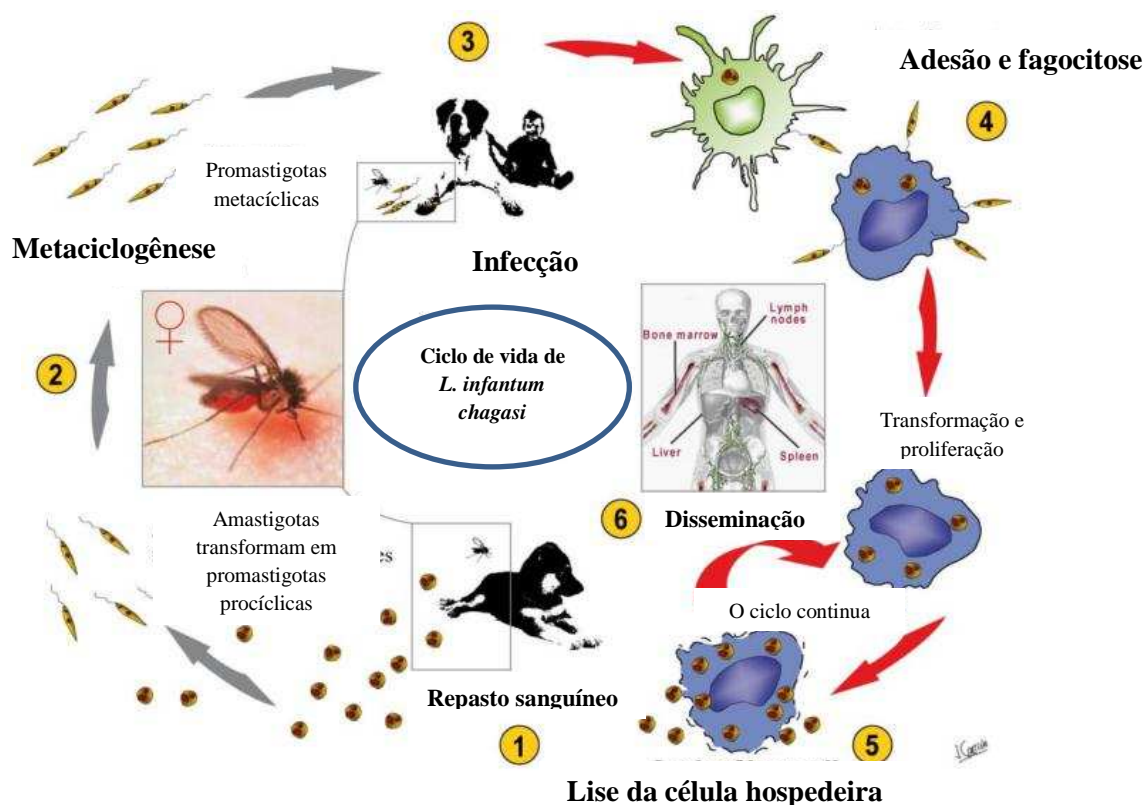


Figura 2: Ciclo biológico de *L. infantum chagasi*. (1) Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, as fêmeas de flebotomíneos ingerem amastigotas livres, bem como amastigotas intracelulares. No trato intestinal do vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas. (2) As promastigotas procíclicas multiplicam e se transformam em promastigotas metacíclicas, forma infectante, que rompe a válvula estomacal de onde são regurgitadas. (3) As promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado suscetível (Ex: cão e homem) durante o próximo repasto sanguíneo. (4) As promastigotas são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear. No interior dessas células, as promastigotas se transformam nas formas amastigotas intracelulares e se multiplicam intensamente. (5) As células infectadas sofrem lise, liberando formas amastigotas na circulação sanguínea. (6) As amastigotas livres podem infectar novas células fagocitárias do sangue, baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides, propagando a infecção e repetindo o ciclo. **Adaptado de:** NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

2.3 Manifestações clínicas

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de pequenas lesões cutâneas a acometimento de órgãos internos e de formas assintomáticas da doença a casos letais. Os fatores que determinam as diferentes formas clínicas incluem a espécie do agente infeccioso, a susceptibilidade genética do hospedeiro, idade e estado nutricional e imunológico. A patologia pode se manifestar como Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (LDPK) (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; KEVRIC et al., 2015).

A LC é a forma menos grave da doença caracterizada por uma ou mais lesões ulcerativas ou nodulares que, geralmente, se originam no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor, ocorrendo, especialmente, nas superfícies corporais mais expostas ao inseto - Figura 3A. As lesões podem se desenvolver semanas, meses ou até mesmo anos após a infecção. Diversas espécies de *Leishmania* são responsáveis por essa forma da doença. São elas: *L. tropica* e *L. major* no Velho Mundo e *L. braziliensis*, *L. amazonenses*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis* nas Américas do Sul e Central. Algumas lesões podem curar espontaneamente dentro de semanas ou meses, como nos casos de lesões provocadas por *L. mexicana* que podem apresentar cura espontânea dentro de 3 a 4 semanas e de lesões provocadas pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis* que podem ser resolvidas após 6 meses sem nenhum tratamento (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Na LCD, lesões nodulares de tamanhos variados surgem nas regiões da face, orelhas, cotovelos, joelhos e podem, eventualmente, se alastrar pela superfície corporal. Em alguns casos, as erupções cutâneas apresentam uma aparência verrucosa e xantomatosa - Figura 3B. Geralmente não há cura espontânea das lesões. Essa patologia tem sido associada apenas as espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; HANDLER et al., 2015).

A LMC é causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. panamensis* e é decorrente da metástase do parasito via linfática ou hematogênica para os tecidos da mucosa oral e do trato respiratório superior. Pode se manifestar meses ou anos após a

resolução de lesões cutâneas primárias. As lesões nasais são as mais frequentes, com a formação de nódulos e infiltração no septo cartilaginoso superior, levando à obstrução da narina - Figura 3C. Na fase final da doença, podem ocorrer mutilações graves com obstrução e destruição das narinas, faringe e laringe e o paciente pode desenvolver quadros de infecção secundária e desnutrição. A maioria dos casos de LMC são relatados no Brasil, Bolívia e Peru e com menor frequência na Venezuela, Equador, Colômbia e Paraguai (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LV, também conhecida como calazar (Kala-azar), é a forma mais grave dentre as formas clínicas das leishmanioses, podendo ser fatal, caso não seja tratada. Tem como agentes etiológicos os parasitos do complexo *L. donovani*, que incluem *L. donovani* e *L. infantum chagasi*. Casos menos comuns causados por *L. tropica* foram reportados no Oriente Médio. A patologia é caracterizada pelo acometimento visceral como resultado da proliferação do parasito em células fagocitárias do baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides. O período de incubação pode variar de 10 dias a mais de um ano. Os sintomas e sinais clínicos mais comuns incluem febre, náusea, calafrios, perda de peso, anorexia, dores abdominais, epistaxe, esplenomegalia com ou sem hepatomegalia, pancitopenia e imunossupressão - Figura 3D. Muitas infecções são assintomáticas, no entanto, as condições nutricionais e imunológicas do hospedeiro podem contribuir com a progressão e gravidade da patologia (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; KEVRIC et al., 2015). Os indivíduos portadores do vírus HIV apresentam grandes riscos de desenvolver complicações relacionadas com leishmaniose, podendo partir de uma infecção sintomática inicial ou reativação da infecção por *Leishmania*. Por outro lado, diante de um quadro de LV é observado um aumento na taxa de replicação do vírus HIV. O efeito sinérgico negativo de ambas as infecções sobre a resposta celular do indivíduo ocorre devido a similaridades entre as células imunes alvos, resultando em uma crônica estimulação do sistema imunológico (PRESS, 2016).

Uma doença cutânea pode se manifestar em pacientes que receberam tratamento para LV e que permaneceram assintomáticos por meses e anos, a chamada Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (LDPK). Nesses indivíduos ocorre uma progressiva e fulminante proliferação de parasitos remanescentes na pele, levando ao surgimento de máculas difusas despigmentadas e de lesões maculo-papulares ou nodulares em todas as partes do corpo. A patogênese da LDPK, que ainda é pouco compreendida, parece estar

relacionada a uma intensa produção de IFN- γ pelo sistema imunológico do hospedeiro em resposta aos parasitos dérmicos remanescentes. Em biópsias de lesões são encontrados macrófagos infectados por amastigotas com o mesmo genótipo do parasito que levou à LV. A LDPK ocorre principalmente na Índia e Sudão em pacientes infectados por *L. donovani*. No Novo Mundo, essa forma clínica da leishmaniose é extremamente rara (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; KEVRIC et al., 2015; HANDLER et al., 2015).

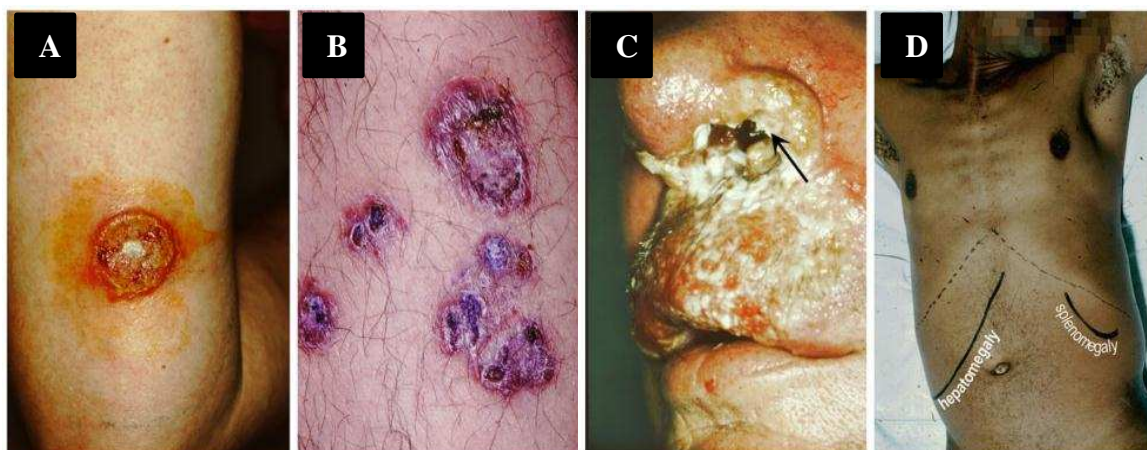


Figura 3: Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) LC caracterizada por lesão ulcerativa no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. (B) LCD caracterizada por lesões de tamanhos variados com aparência verrucosa e xantomatosa na superfície corporal. (C) LMC decorrente da metástase de *L. braziliensis* para os tecidos das mucosas nasal e oral. (D) LV com visível hepatomegalia e esplenomegalia. **Adaptado de:** BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 6, p. 619–634, 2015.

Como se pode observar, a leishmaniose apresenta diferentes manifestações clínicas e um dos fatores que levam a essas diferenças é a espécie do parasito, como mencionado anteriormente. O parasito apresenta fatores de virulência que compreendem um conjunto de recursos que potencializam sua capacidade em causar doença no hospedeiro, porém não são necessários para sua viabilidade por si só. *Leishmania* apresenta fatores de virulência que podem afetar a invasão da célula hospedeira, a modulação da resposta imune, a tolerância ao estresse oxidativo e ao estresse de temperatura. Os fatores de virulência, portanto, são diferentes entre as espécies do parasito. Um exemplo é a correlação da virulência com a tolerância ao estresse de temperatura observado em diferentes espécies de *Leishmania*. Espécies cutanotrópicas

são menos resistentes a altas temperaturas do que espécies vicerotrópicas, característica esta que se apresenta em consonância com as temperaturas limites de seus órgãos alvos (BIFELD; CLOS, 2015).

2.4 Epidemiologia da LV

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde – OMS, anualmente ocorrem aproximadamente 300.000 casos de LV, e destes, mais de 20.000 são fatais (WHO, 2016). A LV está presente em quatro dos cinco continentes e é endêmica em 98 países (WHO, 2010). Em 2012 a OMS iniciou um levantamento epidemiológico em 102 países, regiões ou territórios em todo o mundo, e estimou que 90% dos casos globais de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul, onde 556 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrair a doença (WHO, 2016). Esses dados, porém, podem não retratar a real incidência e taxa de letalidade da LV, uma vez que somente dois terços dos países endêmicos atualmente relatam a incidência dessa patologia e, adicionalmente, existem falhas no sistema de vigilância epidemiológica (ALVAR et al., 2012). A elevada incidência de LV nos países endêmicos dessa parasitose está diretamente relacionada ao nível socioeconômico da população, falhas no acesso ao tratamento e medidas de prevenção, migração de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e as condições ambientais favoráveis para a proliferação do inseto vetor (READY, 2014).

Na América Latina o país mais afetado pela LV é o Brasil, com aproximadamente 97% dos casos humanos. Nas últimas três décadas, foram notificados oficialmente mais de 70.000 casos e mais de 3.800 mortes por LV no Brasil (LARA-SILVA et al., 2015). De 2010 a 2014, cerca de 17 mil novos casos de LV foram relatados com mais de 1.100 mortes em um quarto dos municípios brasileiros. Mais de 70% dos casos ocorrem em 200 municípios sendo que um quarto deles possuem mais de 100.000 habitantes, incluindo Aracaju, (Sergipe), Araguaína (Tocantins), Bauru (São Paulo), Belo Horizonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Fortaleza (Ceará), Montes Claros, (Minas Gerais), São Luís, (Maranhão) e Teresina (Piauí) (WERNECK, 2016).

No Brasil os primeiros casos de LV foram registrados na década de 30 nas regiões Norte e Nordeste, onde a doença era considerada uma zoonose endêmica com caráter eminentemente rural. Alterações ambientais provocados pelo homem, como o desmatamento, crescimento urbano desordenado e a concomitante presença do inseto vetor com animais domésticos, fizeram com que a LV se tornasse cada vez mais urbana e um crescente problema de saúde pública (CELIO; MARZOCHI, 2016; BARATA et al., 2013). O fenômeno da urbanização tem sido apontado como o responsável pelo surgimento de novos focos e ressurgimento de outros em cidades de pequeno e médio porte (BARATA et al., 2013; PRADO et al., 2011).

Governador Valadares, situada na região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais, apresenta casos registrados de LV na década de 60. Contudo, um programa de controle da LV foi adotado e o município passou a ser considerado área endêmica controlada. No início da década de 90 o programa foi interrompido e no período de 2008 a 2011, 86 casos da doença foram registrados com uma taxa de letalidade de aproximadamente 16%. A alta densidade de espécies de flebotomíneos nas áreas peridomiciliares, sendo 90% de *Lu. longipalpis* e a elevada prevalência de LVC (4.992 cães soro positivos), foram apontadas como os principais fatores responsáveis pelo ressurgimento da LV na região (BARATA et al., 2013). Em Montes Claros, cidade de médio porte situada na região norte do estado de Minas Gerais, a alta prevalência de cães infectados e alta densidade populacional do inseto vetor, mais as condições climáticas locais, fazem com que essa região seja considerada uma área ativa de transmissão de LV. No período entre 2007 e 2009 foram registrados 95 casos humanos da doença, sendo 6 casos fatais (MICHALSKY et al., 2009; PRADO et al., 2011). Entre os anos de 2006 e 2014 a incidência de LV na capital mineira Belo Horizonte aumentou de 1,6 para 5,5 casos a cada 100.000 habitantes e os casos fatais variaram de 12,8 a 21,4%. No mesmo período, aumentou de 3,2 para 13,9% a soropositividade de cães infectados por *L. infantum chagasi*. Os aumentos registrados coincidem com a abundância do *Lu. longipalpis* nos ambientes intra e peridomiciliares (VIANNA et al., 2016).

O Ministério da Saúde publicou no ano de 2006 o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) com a finalidade de conter o avanço, morbidade e letalidade da doença. As medidas incluem o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução das populações de flebotomíneos, eliminação dos

reservatórios e atividades de educação em saúde. No entanto, casos autóctones humanos vêm se expandindo em áreas urbanas endêmicas de LV. Em uma pesquisa realizada em seis municípios endêmicos da doença (Bauru, Fortaleza, Belo Horizonte, Goiânia, Campinas e Campo Grande), foram identificados diversos problemas relacionados ao cumprimento do PVCLC, entre eles a descontinuidade dos programas de controle, seja por falta de recursos financeiros, pelo pouco envolvimento dos gestores municipais ou ainda pela recusa da população que impede a entrada de técnicos nas residências para o controle químico dos vetores e para o controle do reservatório canino (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA, 2006; ZUBEN et al., 2016).

2.5 Resposta imunológica na LV

Nas leishmanioses, os agentes etiológicos são protozoários parasitas intracelulares obrigatórios. O padrão protetor contra a infecção por esses parasitos requer a atuação da imunidade adaptativa celular do hospedeiro, na qual ocorre a ativação de linfócitos Th1, enquanto que o padrão de susceptibilidade à doença envolve a resposta imune humoral com a ativação de linfócitos Th2. Na fase inicial da infecção, componentes da resposta imune inata exercem um papel essencial no controle da entrada do parasito no hospedeiro, bem como da sua proliferação (MUTISO et al., 2013; SATO et al., 2014).

Ao realizar o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos introduzem saliva e as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro. A inoculação do parasito e substâncias da saliva do inseto vetor, bem como o dano provocado pela picada, induz uma resposta inflamatória no local, via sistema imune inato, com o recrutamento de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, plaquetas e componentes do sistema do complemento (SATO et al., 2014). Este último é composto por várias proteínas plasmáticas inativadas que, ao se ligarem na superfície do patógeno, são ativadas formando uma reação em cascata que resulta na quimiotaxia, opsonização, fagocitose e lise celular do patógeno com a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) parecem ser importantes na sensibilização das células da defesa inata e no reconhecimento do parasito. Eles reconhecem moléculas presentes na superfície do parasito, como por exemplo, a

molécula de lipofosfoglicano - LPG, que atua como padrão molecular associado ao patógeno (PAMP). O reconhecimento dessas moléculas desencadeia a ativação de uma via de sinalização intracelular importante para dar início a resposta inflamatória e controlar a proliferação do parasito (SATO et al., 2014; DE FREITAS et al., 2016).

A resposta imune inata além de prevenir o crescimento e propagação do parasito no início da infecção, também atua como fonte de citocinas juntamente com a imunidade celular adquirida. Diferentes citocinas estão envolvidas na proteção e patogênese da LV (BHATTACHARYA; ALI, 2013). A resolução da infecção está associada ao perfil de resposta Th1 e Th17, enquanto a progressão e susceptibilidade à doença está associada ao perfil de resposta Th2 (DE FREITAS et al., 2016).

Macrófagos classicamente ativados produzem interleucina-12 (IL-12), que, ao interagir com as células T imaturas (Th0) fazem com que essas se diferenciam em células T CD4+ efectoras com padrão Th1. A ativação das células Th1 resulta na produção de interleucina-2 (IL-2), Interferon gama (IFN- γ), linfotóxina alfa (LT α) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Essas citocinas próinflamatórias, juntamente com o TNF também produzido pelos próprios macrófagos infectados, ativa as vias microbicidas nos vacúolos parasitóforos do macrófago. Os mecanismos microbicidas incluem a produção de óxido nítrico (NO) pela ação da enzima NO sintetase induzível (iNOS) sobre o substrato L-arginina. A atividade leishmanicida de NO contribui com o controle da proliferação das formas amastigotas internalizadas nos macrófagos e, conseqüentemente, com a resolução da infecção (GRADONI; ASCENZI, 2004; FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016b).

Durante a infecção no baço, células dendríticas (DCs) secretam citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e interleucina-23 (IL-23) que promovem a diferenciação de células Th0 em células T CD4+ efectoras com padrão Th17. Estas células produzem interleucina-17 (IL-17), que contribui com a migração, recrutamento e ativação de neutrófilos para o local da infecção (RODRIGUES et al., 2016b; BHATTACHARYA; ALI, 2013).

A interleucina-4 (IL-4) é a principal citocina do subgrupo Th2, sendo responsável pela diferenciação e ativação dos linfócitos Th0 em linfócitos Th2 e, conseqüentemente, ao direcionamento da resposta imune para uma resposta humoral. A IL-4 foi considerada inicialmente como um marcador ativo da LV

(BHATTACHARYA; ALI, 2013; FALEIRO et al., 2014). Hoje parece estar bem estabelecido que a interleucina-10 (IL-10), importante citocina reguladora, exerce um papel fundamental na supressão imune, na persistência do parasito e cronificação da doença. Durante a LV, a IL-10 pode ser produzida por vários tipos celulares incluindo células T CD4+ e CD8+, macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e DCs. Esta citocina desativa as vias microbicidas dos macrófagos, diminui a expressão de MHC e de moléculas co-estimuladoras, além de inibir a produção de IFN- γ (RODRIGUES et al., 2016b; DE FREITAS et al., 2016).

Na LV o parasito tende a se disseminar para o fígado, baço, medula óssea e linfonodos. Diferenças morfológicas e fisiológicas entre esses órgãos fazem com que a resposta imune seja órgão-específica. Em humanos, ocorre uma infecção aguda no fígado com uma rápida multiplicação parasitária nas primeiras 4 semanas e o crescimento do parasito é controlado na 6^a a 8^a semana após a infecção. Em contrapartida, no baço e na medula óssea, a carga parasitária aumenta após a 4^a semana e uma infecção crônica se estabelece. Os macrófagos residentes no fígado, células de Kupffer (KCs), possuem uma capacidade inata limitada para eliminar o parasito intracelular. Por isso a carga parasitária aumenta nas primeiras semanas. A infecção é controlada com a formação de granulomas inflamatórios, formados a partir do recrutamento de monócitos, neutrófilos e células T que se aglomeram em torno das KCs infectadas. As células imunes recrutadas produzem citocinas pró-inflamatórias que ativam os mecanismos leishmanicidas das KCs, controlando a infecção (FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016b; DE FREITAS et al., 2016). O baço é organizado em microdomínios denominados polpa vermelha (RP), polpa branca (WP) e zona marginal (MZ), interface que separa os dois primeiros. Nestes microdomínios residem populações de macrófagos estrategicamente localizados para eliminar patógenos ou partículas exógenas que entram no órgão pela circulação sanguínea. A WP possui organização semelhante à dos linfonodos, com folículos de células T e de células B. Ao contrário das KCs, as populações esplênicas de macrófagos possuem uma excelente capacidade inata de eliminar o parasito intracelular. É estimado que, nas primeiras 24 horas após a infecção, aproximadamente 50% dos parasitos são eliminados pelas populações de macrófagos na MZ. No entanto, durante a LV ocorre um intenso remodelamento vascular no baço que provoca o deslocamento e a perda de algumas populações de macrófagos, além de afetar a migração de células T e DCs para as regiões

de células T e folículos de células B. Na terceira semana após a infecção, a carga parasitária começa a aumentar lentamente, marcando o início da fase crônica (NIETO et al., 2011; FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016b; DE FREITAS et al., 2016). Esta fase pode ser caracterizada pela exaustão das células T que passam a ter suas funções debilitadas, como a perda da citotoxicidade, diminuição da produção de IL-2 e proliferação. Em situações mais graves, essas células também se tornam incapazes de produzir TNF e IFN- γ , sendo eliminadas por apoptose (RODRIGUES et al., 2016b; WHERRY; KURACHI, 2015).

O padrão de resposta imune que leva à proteção ou à susceptibilidade à leishmaniose foi estabelecido por inúmeras pesquisas ao longo dos anos, indicando que um perfil de resposta Th1 promove a resistência à doença, enquanto que um perfil de resposta Th2 leva à persistência. No entanto, em alguns trabalhos tem-se observado que a eficácia protetora de algumas vacinas está relacionada a um perfil misto de resposta Th1/Th2 ou com um balanço entre as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ /TNF e as citocinas IL-10 e IL-4 em infecções por parasitos das espécies *L. donovani* e *L. major* (SINGH et al., 2012; STOBBER et al., 2005; LOEUILLET et al., 2016). Atualmente se entende que o controle da doença está realmente relacionado com a ação de resposta Th1, enquanto que a susceptibilidade está relacionada com deficiência neste tipo de resposta, e não necessariamente pela simples presença de resposta Th2 (como observado em camundongos BALB/c, que são altamente susceptíveis por produzirem quantidades exageradas de IL-4 frente à infecção por *L. major* ou pela produção de IL-10. Além disso, é importante salientar que, na LV ativa, a presença de IL-10 pode estar relacionada com resposta protetora por modular a resposta Th1 que, se não controlada, pode também se envolver na patogênese da doença (SINGH et al., 2012).

2.6 Tratamentos e vacinas para a LV

O tratamento da LV tem-se limitado à utilização de quimioterápicos. No entanto, esse tem sido um grande desafio devido à toxicidade de medicamentos com preços acessíveis à população em geral, alto custo dos medicamentos menos tóxicos e efeitos como imunossupressão do paciente e resistência dos parasitos mediante algumas

drogas (JOSHI et al., 2014; BIFELD; CLOS, 2015). Os quimioterápicos utilizados são os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, paramomicina e pentamidina, que são derivados de moléculas naturais ou sintéticas e possuem modos de ação distintos. (NO, 2016; BIFELD; CLOS, 2015).

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira linha no tratamento da LV. Seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido. Provavelmente esses fármacos agem de forma multifatorial sobre os processos moleculares do parasito de modo a influenciar a atividade microbicida dos macrófagos. No entanto, provocam vários efeitos colaterais como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, indução de pancreatite, podendo ainda provocar resistência no parasito (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; NO, 2016).

A anfotericina B apresenta atividades antifúngica e antiparasitária. O modelo de ação mais estudado e aceito desse agente revela a formação de poros na membrana do parasito que permitem a passagem de água, íons e moléculas de glicose, levando-o à morte. O uso da anfotericina B é limitado devido a efeitos secundários como hematotoxicidade e nefrotoxicidade. Nos últimos anos tem-se utilizado uma formulação lipossomal (AmBisome®) administrada via intravenosa, com uma taxa de cura de 95%. Porém, o alto custo desse tratamento é um fator limitante para os pacientes, especialmente de países em desenvolvimento (NO, 2016; MEHEUS et al., 2010).

A miltefosina se tornou, em 2002, o primeiro tratamento oral para LV. A atividade leishmanicida desse composto envolve ação sobre o metabolismo de fosfolipídeos, da biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, além de afetar a função mitocondrial pela despolarização do potencial de membrana e inibição do citocromo c oxidase, que provavelmente está associada à morte do parasito por apoptose. Ensaios de toxicidade em modelos animais revelaram que esse composto possui toxicidade teratogênica, sendo contraindicado para gestantes (NO, 2016; ZUO et al., 2011; SUNDAR et al., 2012).

A paramomicina consiste em um antibiótico isolado de *Streptomyces krestomuceticus* e sua atividade leishmanicida foi identificada na década de 60. Em triagens clínicas realizadas na Índia, a formulação parenteral desse fármaco apresentou uma taxa de cura de 94,6%. Seu mecanismo de ação também é pouco conhecido, mas

parece influenciar a síntese de proteínas e o potencial de membrana mitocondrial dos parasitos. Cepas de *L. donovani* adquiriram resistência quando expostas ao fármaco em experimentos *in vitro* (NO, 2016; HENDRICKX et al., 2012; SUNDAR et al., 2007).

A pentamidina é um composto utilizado como tratamento de segunda linha para a LV e em pacientes refratários após o tratamento com antimoniais pentavalentes. Seu mecanismo de ação parece promover a apoptose do parasito por atuar sobre as mitocôndrias, afetando o complexo II da cadeia respiratória e induzindo o aumento do influxo de Ca^{2+} na célula (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006; NO, 2016).

Os desafios relacionados à utilização de quimioterápicos para o tratamento da LV têm motivado intensas pesquisas no âmbito vacinal e este pode se tornar o método mais eficaz de controle da LV. Diversos candidatos a vacina contra leishmaniose já foram testados, contudo, até o momento, não há formulações disponíveis para seres humanos (BIFELD; CLOS, 2015; GILLESPIE et al., 2016).

As vacinas são classificadas em três categorias: as vacinas de primeira geração, produzidas a partir de *Leishmania* morta ou atenuada; as vacinas de segunda geração, baseadas em subunidades do parasito; e as vacinas de terceira geração, formuladas a partir de material genético do agente etiológico (SRIVASTAVA et al., 2016; JAIN; JAIN, 2015).

O primeiro método de vacinação, conhecido por Leishmanização, surgiu no Oriente Médio e na Ásia Central onde era amplamente praticado. O método consiste na introdução de pequenas quantidades de formas vivas de *L. major* em um local não exposto do corpo, utilizando espinhos ou instrumentos cortantes, a fim de provocar uma lesão cutânea no indivíduo. Após a cura espontânea da lesão, o indivíduo adquire proteção contra infecções naturais subsequentes, o que previne o risco de lesões faciais. Questões relacionadas à padronização dessa técnica, relatos do desenvolvimento de lesões persistentes e o risco de provocar uma infecção disseminada em indivíduos imunossuprimidos limitaram uma real implantação desse método de vacinação (MUTISO et al., 2013; GILLESPIE et al., 2016). Apenas no Uzbequistão a Leishmanização é uma prática licenciada como vacina para populações de alto risco, com a inoculação de uma mistura de parasitos vivos e mortos de *L. major* (SRIVASTAVA et al., 2016).

Em substituição à Leishmanização surgiram as vacinas de primeira geração, produzidas a partir de parasitos mortos ou atenuados. Esse tipo de vacina é considerado padrão ouro contra patologias provocadas por parasitos intracelulares. A utilização de parasitos vivos atenuados é capaz de mimetizar o curso natural da infecção, por expor o sistema imunológico do indivíduo a todo arsenal de antígenos presentes no parasito. Vários processos têm sido utilizados para produzir *Leishmania* atenuada, como altas passagens em meios de cultura, seleção por sensibilidade à temperatura, mutagênese química e irradiação. Apesar da proteção fornecida por esse tipo de vacina, sua utilização para uso humano encontra limitações. Mutações genéticas aleatórias e indefinidas do parasito podem levar à redução da imunidade protetora caso o protozoário não resista em tempo suficiente para a montagem de uma reposta imune ou podem provocar a perda de importantes epítomos. Outra limitação é decorrente de uma provável reversão do potencial de virulência do parasito, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (NOAZIN et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2016). A utilização de parasitos mortos para a produção de vacina pode parecer uma alternativa mais segura e eficaz, no entanto, esse tipo de vacina não é capaz de mimetizar uma infecção natural e é menos imunogênica. (SRIVASTAVA et al., 2016).

As vacinas de segunda geração são formuladas a partir de subunidades purificadas ou recombinantes do parasito, como moléculas imunogênicas presentes na superfície de *Leishmania* capazes de gerar uma resposta imune protetora; moléculas relacionadas à virulência do parasito, que uma vez bloqueadas pelo sistema imune ativado, pode ter sua função comprometida, resultando na interrupção da infecção; e ainda coquetéis de moléculas imunogênicas e/ou relacionadas à virulência do parasito, com o poder de aumentar o potencial protetor da vacina. Diversos antígenos foram avaliados como candidatos a vacina contra leishmaniose, dentre eles a molécula GP63 (BHOWMICK; RAVINDRAN; ALI, 2008; SINHA et al., 2011), o LPG (MARTÍNEZ SALAZAR et al., 2014), antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (HERAVI SHARGH et al., 2012; FIROUZMAND et al., 2013; CHAMAKH-AYARI et al., 2014), GP63 + proteína de choque térmico (HSP70) (KAUR et al., 2011), ligante de manose-fucose (FML) (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2008; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2009), proteína 11 da membrana do cinetoplasto (KMP-11) (DE MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015), proteína ribossomal (PO) (PEREIRA et al., 2015)

dentre vários outros antígenos purificados de *Leishmania*. A maioria deles encontra-se listada em um recente trabalho de revisão feito por JAIN (JAIN; JAIN, 2015).

As vacinas de terceira geração são formuladas a partir de informações genéticas do agente etiológico com a inserção de genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos imunogênicos em DNA plasmidial ou em vetores virais (MARQUES-DA-SILVA et al., 2005; COSTA et al., 2014; JAIN; JAIN, 2015).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz na prevenção e na terapêutica das leishmanioses perdura por quase um século, mas até o momento não existe nenhuma formulação licenciada para uso em humanos capaz de reduzir os casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH). A Leish-F1 é a primeira candidata à vacina em fases I (segurança) e II (imunogenicidade) de ensaios clínicos em humanos. Trata-se de uma poliproteína recombinante formada pela fusão de três proteínas presentes em várias espécies de *Leishmania*, incluindo *L. donovani* e *L. infantum chagasi*. As primeiras fases de triagem foram realizadas nos Estados Unidos, Brasil, Colômbia, Peru e Índia e apresentou segurança e imunogenicidade em populações endêmicas e não endêmicas (GILLESPIE et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; CHAKRAVARTY et al., 2011). Se tratando de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), existem duas vacinas licenciadas pelo Ministério da Saúde e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Leish-Tec[®] e a Leishmune[®], ambas utilizadas para a vacinação de cães. A Leish-Tec[®] trata-se de uma vacina recombinante tendo o antígeno A2 de amastigotas de *Leishmania* em sua formulação. A imunidade protetora dessa vacina frente ao desafio com *L. infantum chagasi* alcançou aproximadamente 40% de proteção e a avaliação envolveu 7 cães beagle vacinados e 7 cães controles (FERNANDES et al., 2008). Porém em um estudo realizado no município de Porteirinha, MG, área endêmica de LVC, a vacina alcançou 96,4% de proteção, segundo critérios parasitológicos (REGINA-SILVA et al., 2016). A Leishmune[®] é composta de frações do ligante de manose-fucose (FML) de *L. donovani* com a adição do adjuvante saponina. Na terceira fase da triagem clínica 97% dos cães vacinados foram soropositivos para FML e 100% foram positivos para a reação intradérmica de lisados de *L. donovani*. Dois anos após a vacinação, Leishmune[®] apresentou 80% de eficácia (BORJA-CABRERA et al., 2008; MOREIRA et al., 2016). As vacinas para LVC são de extrema importância para o controle da LV, uma vez que podem proporcionar a interrupção do ciclo do parasito que têm o cão como reservatório nos ambientes urbanos e periurbanos (GRADONI, 2015).

Além do potencial imunogênico dos antígenos candidatos a vacinas, a utilização de um adjuvante muitas vezes é essencial para a obtenção de uma resposta imune intensa e duradoura. A adequação de um adjuvante depende de alguns fatores tais como a natureza do antígeno, o tipo de resposta imune desejada, a via de administração e o calendário de imunização (DE JESUS PEREIRA et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016). O adjuvante Incompleto de Freund (AIF) é capaz de estimular uma resposta humoral e um padrão misto de citocinas anti/proinflamatórias como IL-4/IFN- γ , sendo portanto indicado para a obtenção de padrões mistos de resposta imunológica (VITORIANO-SOUZA et al., 2012). O adjuvante Saponina é caracterizado por induzir uma intensa resposta imune do tipo Th1 e produção de linfócitos T citotóxicos contra antígenos exógenos, sendo ideal em vacinas formuladas a partir de subunidades do patógeno, em vacinas direcionadas a patógenos intracelulares, bem como em vacinas terapêuticas para câncer (SUN; XIE; YE, 2009).

2.7 Lectinas e sua utilização como imunógeno

Na produção de vacinas de segunda geração, as lectinas vêm sendo investigada como imunógeno em potencial (MCGREAL et al., 2004; SATO et al., 2014). Essas moléculas correspondem a uma classe de proteínas cuja característica principal é se ligar de forma reversível e específica em carboidratos solúveis presentes em glicoproteínas e glicolipídeos (KOMATH et al., 2006; MARTINS et al., 2015). Essas proteínas são amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais e estão envolvidas em diversos processos celulares que exigem especificidade para reconhecer carboidratos complexos. A atenção para essa classe de moléculas surgiu no século XIX a partir de observações de sua propriedade de aglutinação. Hoje já se sabe que as interações entre lectinas e carboidratos têm aplicações diretas sobre o sistema imunológico, tais como na opsonização e fagocitose de microrganismos, na adesão celular, na ativação e diferenciação de células e no processo de apoptose (NI; TIZARD, 1996; KOMATH et al., 2006).

Lectinas do tipo C presentes em macrófagos e células apresentadoras de antígenos atuam como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) capazes de reconhecer carboidratos específicos presentes na superfície do patógeno e, assim,

diferenciar ligantes próprios de não próprios para que o sistema imune desencadeie uma resposta contra o antígeno (MCGREAL et al., 2004). A galectina-3, uma lectina ligante de glicana, tem despertado atenção quanto à sua capacidade de modular a resposta imune adaptativa. Sugere-se que essa lectina reconhece padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) específicos de *Leishmania major*, além de contribuir na infiltração de neutrófilos para os locais infectados e ajudar na redução da carga parasitária (SATO et al., 2014). Lectinas têm sido aplicadas como marcadores para investigar carboidratos da superfície de diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, auxiliando na distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas, e entre estágios morfológicos distintos do parasito (ANDRADE; SARAIVA, 1999).

Vários protozoários parasitas apresentam lectinas em sua superfície imprescindíveis para o processo de adesão à célula hospedeira, sendo, portanto, efetivas no estabelecimento da patogenicidade do parasito (SINGH et al., 2016). A proteína ligante de heparina (PLH) de *Trypanosoma cruzi* desempenha importante papel no processo de adesão e invasão das formas amastigotas de *T. cruzi* aos cardiomiócitos do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2008). Por outro lado, PLH purificada a partir de formas epimastigotas de *T. cruzi* exerce um papel chave no reconhecimento de glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) presentes na superfície de células epiteliais do inseto vetor (OLIVEIRA et al., 2012). PLH purificada a partir de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresenta características de metaloproteinases e são capazes de se ligar a GAGs. Em experimentos *in vitro* essa lectina demonstrou ser importante no processo de adesão do parasito em células Lulo de *Lu. longipalpis* (DE CASTRO CÔRTEZ et al., 2012b; DE CASTRO CÔRTEZ et al., 2012a). O protozoário *Entamoeba histolytica*, agente etiológico da infecção intestinal conhecida por amebíase apresenta lectinas ligantes de galactose e N-acetil-D-galactosamina que medeiam a adesão do parasito às células da mucosa intestinal do indivíduo infectado, podendo resultar em abscessos extra intestinais, especialmente no fígado. Essas lectinas também contribuem com a atividade citolítica do parasito, além de favorecer com que o mesmo escape da lise mediada pelo complemento (GARCÍA et al., 2015; KATO et al., 2015). A participação dessas moléculas no processo de patogênese da amebíase tem despertado investigações dos seus potenciais imunogênico e protetor, a fim de serem aplicadas na profilaxia da doença (SINGH et al., 2016b). Lectinas de outros protozoários parasitas, tais como *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas* já

foram descritas e sua função em processos de adesão e invasão celular é destacada (SINGH et al., 2016).

Em recente trabalho realizado em nosso laboratório foi revelada a presença de PLH na superfície de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* (PLHLc), utilizando técnica de purificação de proteínas por cromatografia líquida. Ensaio de imunomarcação e de microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos anti-PLHLc demonstraram a distribuição dessa lectina de forma homogênea pela superfície do parasito, em vacúolos citoplasmáticos e no citoplasma, sendo mais evidente próxima ao cinetoplasto. Para avaliar a participação da PLHLc nos processos de infecção do parasito *in vitro*, a lectina foi bloqueada com heparina resultando em uma redução parcial da internalização de *Leishmania* em cultura de macrófagos (MARTINS et al., 2015). A PLHLc pode ser implicada como um fator de virulência de *L. infantum chagasi*, portanto, o bloqueio da sua atividade objetivando diminuir a infecciosidade do parasito ou ainda, utilizá-la como estimuladora do sistema imunológico, a fim de induzir uma resposta protetora contra infecções subsequentes, são nossos objetivos. Em trabalhos iniciais já realizados, a PLHLc nativa se mostrou imunogênica e indutora de resposta mista Th1/Th2 em imunização de camundongos BALB/c.

O histórico da utilização de moléculas presentes na superfície de parasitos como candidatas a vacina, a conhecida participação das lectinas em processos de adesão do parasito à célula hospedeira, a confirmação da presença de PLHLc na superfície de *L. infantum chagasi* e sua capacidade de gerar uma resposta imune com padrão misto TH1/TH2 em ensaios de imunogenicidade levam-nos a investigar a eficácia protetora dessa proteína em experimentos de imunização contra infecção por *L. infantum chagasi* em camundongos. Para isso, se faz necessário quantificar o número de parasitos no baço e fígado de animais vacinados e desafiados com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, bem como avaliar o perfil de citocinas produzidas e a produção de óxido nítrico. Os resultados nos permitirão avaliar a capacidade protetora da formulação vacinal no controle da forma visceral da leishmaniose em mamíferos, com a perspectiva futura de seu uso profilático contra LV humana ou canina.

3. Objetivos

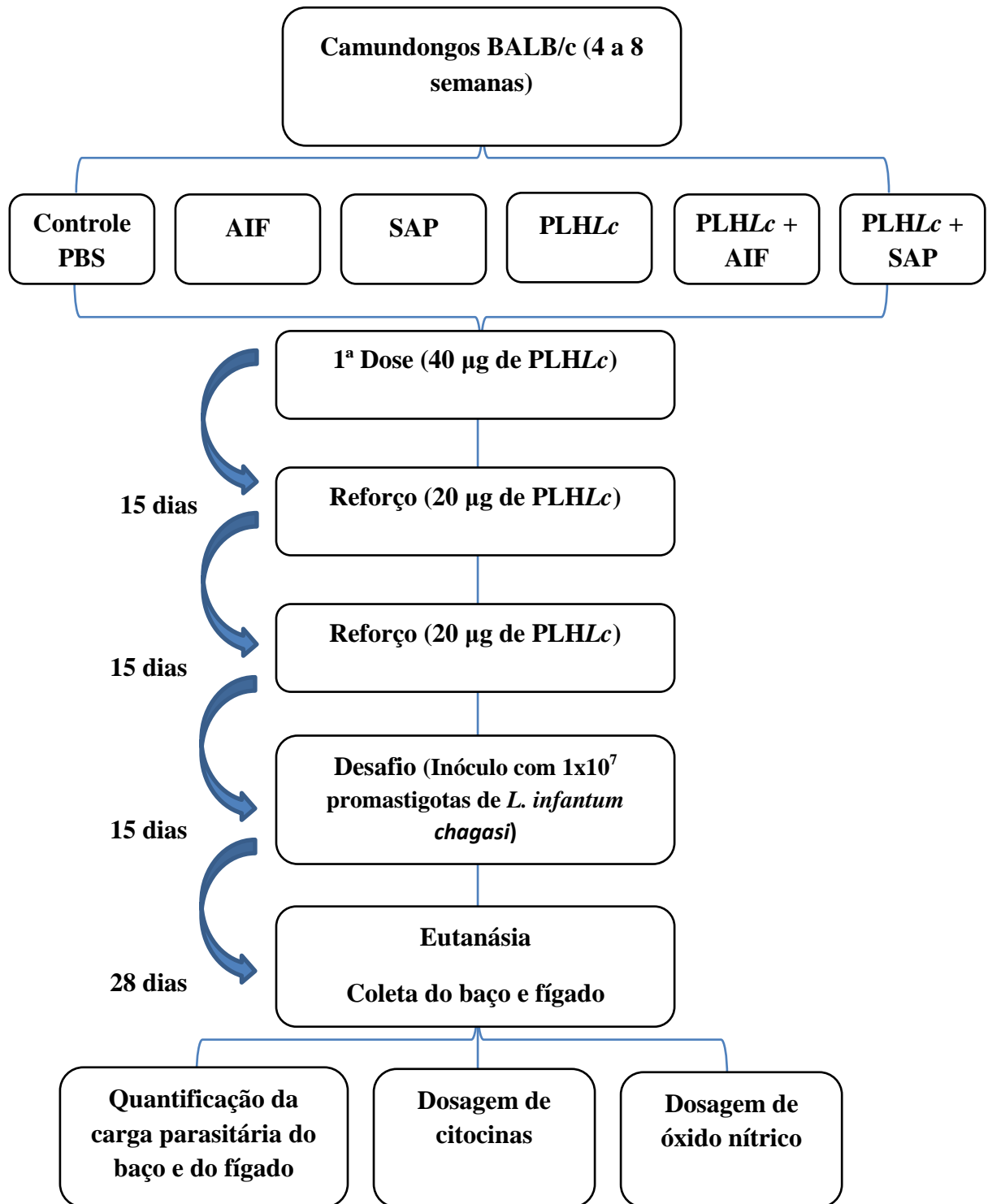
3.1 Objetivo geral

Avaliar a proteção contra infecção por *L. infantum chagasi* induzida por imunização de camundongos BALB/c com proteína ligante de heparina do parasito (PLHLc).

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar parasitos no baço e no fígado de camundongos BALB/c imunizados com PLHLc quatro semanas após desafio com formas promastigotas do parasito;
- Verificar o padrão esplênico de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) e de óxido nítrico produzidos quatro semanas após desafio de camundongos BALB/c com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, previamente imunizados com PLHLc;
- Avaliar, de acordo com os parâmetros acima mencionados, a carga parasitária e o perfil de produção de citocinas induzidos por PLHLc na presença do Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e adjuvante Saponina (SAP).

4. Delineamento experimental



5. Material e métodos

5.1 *Animal experimental*

Camundongos BALB/c fêmea de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa - UFV e do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP, sendo mantidos e manuseados no biotério de experimentação 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: 319/2015).

5.2 *Obtenção de parasitos*

Formas promastigotas totais de *L. 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 Grace completo, composto de Grace[®] (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino inativado a 57°C/30 min (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), 10% de urina humana, L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL), penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) e 250 μ L de hemina bovina, pH 6,5. A placa foi mantida em estufa a 26°C até crescimento dos parasitos, que foram utilizados em experimentos posteriores ou estocados em nitrogênio líquido (-196°C).

5.3 Cultura dos parasitos para obtenção de extrato proteico solúvel

Formas promastigotas de *L. infantum 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. Precipitados de parasitos foram congelados e mantidos em freezer a -20°C .

Os precipitados parasitários foram descongelados, reunidos em tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugados a $1540 \times g/4^\circ\text{C}/20$ min. O sobrenadante foi descartado e quantidade correspondente a 1×10^{13} parasitos foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0 com 100 μL de TRITON X-100. O material foi deixado em repouso por 20 minutos. Após este tempo, foi sonificado em sonicador (Q-Sonica), na frequência de 6 KHz, realizando seis ciclos de 15 segundos com intervalos de 2 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, que foi 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. infantum chagasi* (PLHLc).

5.4 Obtenção de antígeno particulado de *L. infantum chagasi* (AgLc)

Volume correspondente a aproximadamente 1×10^7 parasitos foi suspenso em 3 mL de PBS, pH 7,2 e submetido a 10 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, armazenado a -20°C .

5.5 Purificação de PLHLc do extrato parasitário

O extrato solúvel de *L. infantum chagasi* (10 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 em PBS, foram coletadas e submetidas à técnica de cromatografia de exclusão molecular em coluna de dessanilização “dessalting” (GE) (volume de leito de 1 mL). O material coletado foi aliqotado e armazenado a - 20°C.

5.6 Dosagem de PLHLc e AgLc

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

5.7 Análise eletroforética de PLHLc

Para confirmar a purificação de PLHLc, foi realizada análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (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 suspensa 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 ureia 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).

5.8 Experimentos de imunização

Para compor o teste de imunização foi utilizado um total de 80 camundongos BALB/c, divididos em 3 experimentos independentes: 30 camundongos no 1º experimento, 30 no 2º experimento e 20 no 3º experimento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os 6 diferentes grupos avaliados, a saber: **Grupo Controle** (200 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo AIF** (100 µL de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) emulsificado em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo Saponina** (100 µL de Adjuvante Saponina diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo PLHLc** (PLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo PLHLc + AIF** (emulsão composta de PLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2 + 100 µL de AIF) e **Grupo PLHLc + Saponina** (PLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2 + 100 µL de Saponina). Os animais dos grupos Controle, AIF, PLHLc e PLHLc + AIF foram imunizados por via intraperitoneal e os animais dos grupos Saponina e PLHLc + Saponina foram imunizados por via subcutânea na base da cauda. O tratamento foi constituído de 3 doses com intervalos de 15 dias entre cada dose. Os grupos PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + Saponina receberam 40 µg de PLHLc na primeira dose e 20 µg de PLHLc nas doses de reforço.

5.9 Infecção de camundongos

Para o teste de proteção da vacina, camundongos BALB/c dos seis grupos experimentais foram infectados na veia da cauda, 15 dias após receberem a terceira dose dos tratamentos, com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum chagasi* em fase final logarítmica de crescimento (volume de inóculo: 200 µL em meio Grace base, pH 6,5). Quatro semanas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e a carga parasitária do baço e do fígado foi quantificada por técnica de diluição limitante, conforme descrito na literatura (MARQUES-DA-SILVA et al., 2005).

5.10 Eutanásia

Quatro semanas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados para a realização dos ensaios de quantificação da carga parasitária no baço e no fígado e dosagem de citocinas e óxido nítrico a partir de sobrenadante de cultura de esplenócitos. A eutanásia foi realizada pela técnica de deslocamento cervical em substituição à utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis recomendados pela Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), visto que o uso de anestésicos pode interferir na resposta imune dos animais (THOMPSON et al., 2002; MARKOVIC; MURASKO, 1990).

5.11 Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado

Baço e fígado foram extraídos em condições assépticas e utilizados para a quantificação da carga parasitária. O baço foi coletado inteiro, pesado e macerado em meio de lavagem (meio DMEM, pH 7,2, com bicarbonato de sódio, suplementado com 1% SFB inativado a 57°C/30 min, penicilina G 100 U/mL e L-glutamina 2 mM). A suspensão proveniente da maceração foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL e 1/5 do sobrenadante da suspensão foi utilizado para a quantificação. Entre 50 e 100 mg do fígado foi coletado, pesado, macerado em meio de lavagem e a suspensão foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL. O restante do fígado foi pesado para obtenção da massa total do órgão. A quantificação da carga parasitária foi realizada pela técnica da diluição limitante (TITUS, 1985). De acordo com essa técnica, os sobrenadante provenientes da primeira centrifugação foram centrifugados a 1540 x g/4°C/10 min e o sedimento ressuspendido em 500 µL de meio Grace completo, pH 6,5. O volume de 200 µL de cada suspensão foi distribuído, em duplicata, nos primeiros poços da placa de fundo chato de 96 poços. Nos demais poços foram adicionados 160 µL de meio Grace completo, A partir daí foram realizadas diluições 1:5, transferindo 40 µL de poço em poço, até o décimo segundo poço. As placas foram vedadas e incubadas em estufa a 25°C para avaliação da presença de *Leishmania* por até 10 dias. Ao final, foi calculado o número de *Leishmania* por fragmento observando-se o último poço em que havia a presença do parasito. O

resultado foi expresso como a média dos logaritmos do número de parasitos por órgão total e a média dos logaritmos do número de parasitos por miligrama de tecido.

5.12 Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas e óxido nítrico

A dosagem de citocinas e óxido nítrico foram realizadas a partir de cultura de esplenócitos. Para isso foi utilizado 4/5 do volume de suspensão proveniente da maceração do baço, correspondente a 4/5 do órgão. A suspensão foi centrifugada a $170 \times g/4^{\circ}/10$ min em tubo de fundo cônico de 15 mL. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 2 mL de solução de lise de hemácias (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144 mM), pH 7,2. Após 2 minutos, foram adicionados 8 mL de meio de lavagem ao volume contido no tubo e este foi centrifugado a $170 \times g/4^{\circ}/10$ min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 5 mL de meio DMEM, pH 7,2, suplementado com 10% de SFB inativado a $57^{\circ}\text{C}/30$ min, penicilina G 100 U/mL e L-glutamina 2 mM. As células da suspensão foram diluídas em meio de lavagem na proporção 1:25, coradas com igual volume de azul de Tripán a 0,4% em PBS e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foi coletado o volume de suspensão correspondente a 5×10^6 células/mL e o volume correspondente a 9 poços (4,5 mL), foi ajustado com meio DMEM, pH, 7,2, 10% SFB. As suspensões foram distribuídas, em duplicata, em placa de fundo chato de 48 poços sem estímulo ou estimuladas com 25 μg de AgLc. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C}/5\%$ de CO_2 e os sobrenadantes coletados em 24 e 72 horas de incubação e armazenados a -20°C para as dosagens de citocinas e óxido nítrico.

5.13 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 DMEM, pH 7,2, 10% SFB, realizando-se, a partir daí, 12 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 H_3PO_4 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H_3PO_4 2,5%) a 50 μL de sobrenadante de cultura (amostra), 50 μL de DMEM, pH 7,2, 10% SFB (branco) e aos poços dos padrões. Após 10 minutos 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 em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

5.14 Dosagens de citocinas

Amostras dos sobrenadantes das culturas de esplenócitos coletados com 24 e 72 horas de incubação foram preparadas conforme *BD Cytometric Bead Array (CBA)/Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit* para dosagem das citocinas INF- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4 por citometria de fluxo em BD FACSVersé do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

5.15 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 5 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.

6. Resultados

6.1 Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos BALB/c imunizados com PLHLc

Com o objetivo de avaliar a proteção contra infecção por *L. infantum chagasi* induzida após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP, foi realizado ensaio da quantificação da carga parasitária no baço e no fígado dos animais. O resultado foi expresso como a média de -Log do título de parasitos/órgão e a média de -Log do título de parasitos/miligrama de tecido.

No baço dos animais imunizados com PLHLc + AIF e PLHLc + SAP, foi observada redução da carga de parasitos por órgão e por miligrama de tecido em comparação com o grupo controle PBS (Figura 4).

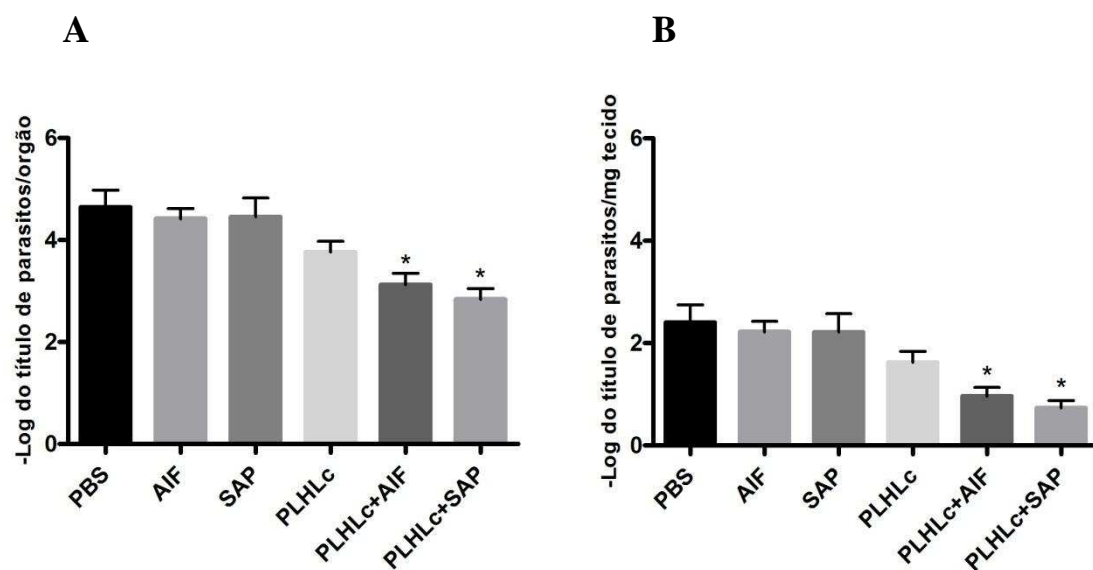


Figura 4: Quantificação da carga parasitária do baço de camundongos BALB/c imunizados. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c foram eutanasiados e 1/5 do baço foi extraído para a quantificação da carga parasitária pela técnica da diluição limitante. A) -Log do título de parasitos por órgão. B) -Log do título de parasitos por miligrama de tecido. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 13 camundongos por grupo. Diferenças entre a carga parasitária dos grupos imunizados e a do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

No fígado, redução da carga de parasitos foi observada apenas no grupo de animais imunizados com PLHLc + SAP quando comparado com o grupo controle PBS. Essa redução pode ser observada tanto na avaliação do título de parasitos/órgão quanto no título de parasitos/miligrama de tecido (Figura 5).

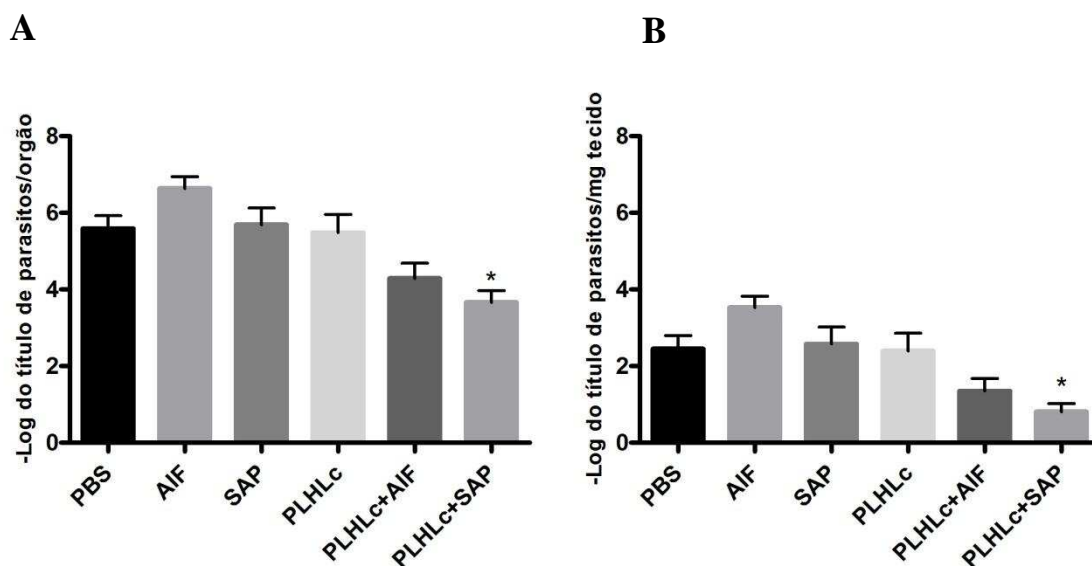


Figura 5: Quantificação da carga parasitária do fígado de camundongos BALB/c imunizados. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c foram eutanasiados e 50 a 100 mg do fígado foram extraídos para a quantificação da carga parasitária pela técnica da diluição limitante. A) -Log do título de parasitos por órgão. B) -Log do título de parasitos por miligrama de tecido. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 12 camundongos por grupo. Diferenças entre a carga parasitária dos grupos imunizados e a do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

6.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) produzidas por esplenócitos estimulados com AgLc após imunização de camundongos BALB/c com PLHLc.

Com o objetivo de avaliar a produção de citocinas relacionadas aos perfis de resposta Th1, Th17 e Th2 induzidas pela imunização com PLHLc, foi realizada a dosagem de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4 em sobrenadante de cultura de esplenócitos submetidos a estímulo com AgLc e coletados em 24 e 72 horas de incubação a 37°C/5% CO₂, conforme descrito na metodologia.

6.2.1 Produção de IFN- γ

Esplenócitos dos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP estimulados com AgLc produziram quantidades significantes de IFN- γ em relação às suas respectivas culturas não estimuladas e aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS nas primeiras 24 horas. Em 72 horas houve aumento ainda mais expressivo na produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados dos grupos imunizados com PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em relação aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS e em relação as suas respectivas culturas não estimuladas (Figura 6).

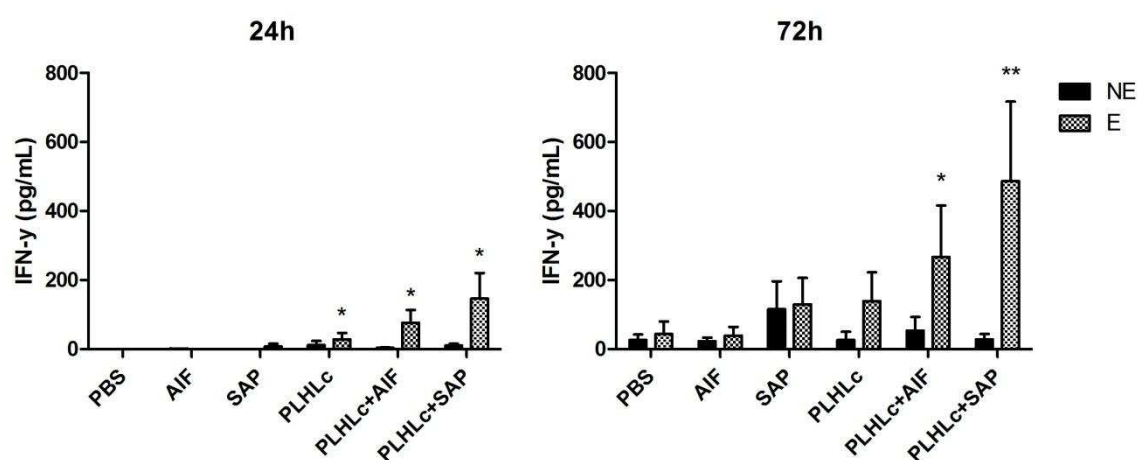


Figura 6: Produção de IFN- γ por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IFN- γ foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de IFN- γ por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.2 Produção de TNF

A produção de TNF em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados coletados em 24 horas, provenientes dos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP, não apresentou diferença em comparação com o grupo controle PBS. Em 72 horas, foi observada menor produção de TNF por esplenócitos estimulados

provenientes dos grupos PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em comparação com os esplenócitos estimulados do grupo controle PBS (Figura 7).

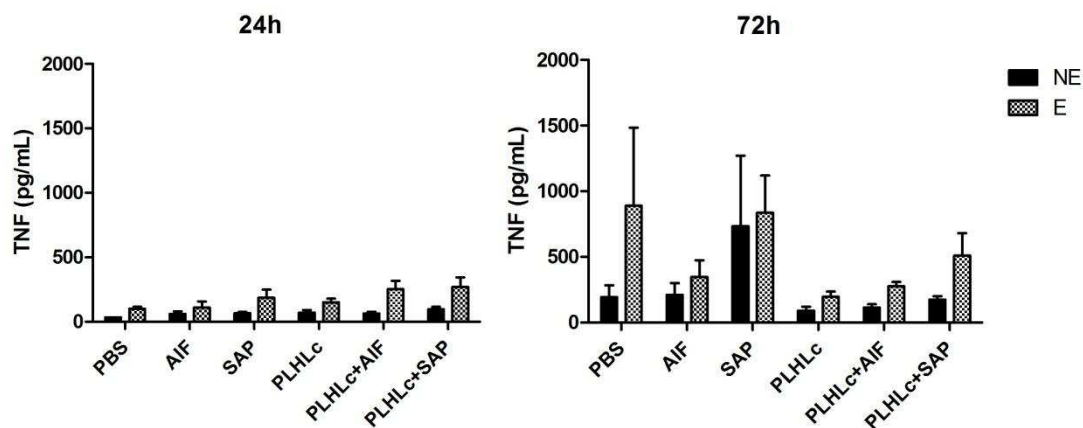


Figura 7: Produção de TNF por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e TNF foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de TNF por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.3 Produção de IL-2

Aumento na produção de IL-2 por esplenócitos estimulados dos grupos imunizados com PLHLc + AIF e PLHLc + SAP foi registrado nas primeiras 24 horas, em relação aos esplenócitos estimulados do grupo controle imunizado com PBS. Em 72 horas, porém, foi registrado aumento dos níveis de IL-2 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos não estimulados dos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP, possivelmente proveniente de alguma contaminação (Figura 8).

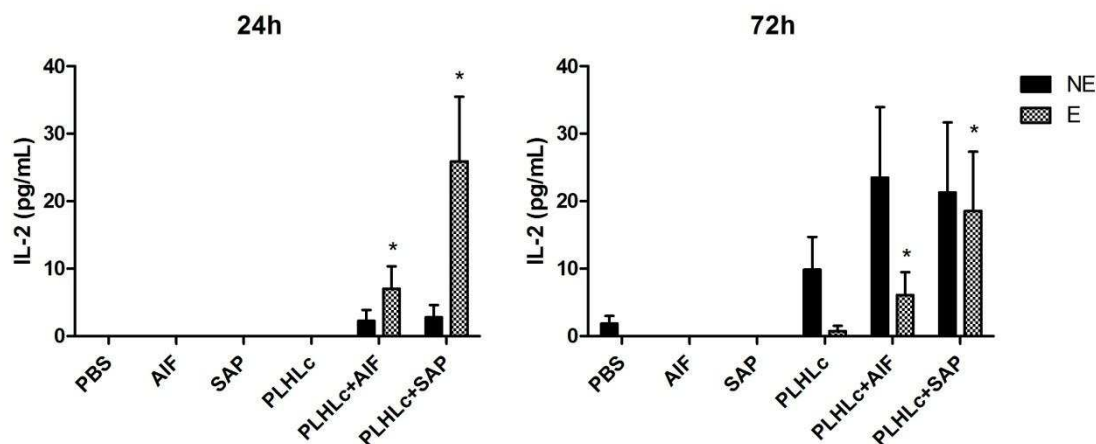


Figura 8: Produção de IL-2 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-2 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com *AgLc* (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de IL-2 por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.4 Produção de IL-17

Em 24 horas houve aumento na produção de IL-17 por esplenócitos estimulados provenientes dos grupos PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em comparação com a do grupo controle PBS. Em 72 horas o aumento na produção de IL-17 por esplenócitos estimulados do grupo PLHLc + SAP manteve diferença estatística em relação ao grupo controle PBS, SAP, porém, foi registrado aumento na produção de IL-17 por esplenócitos não estimulados dos grupos controles e dos grupos PLHLc e PLHLc + AIF (Figura 9).

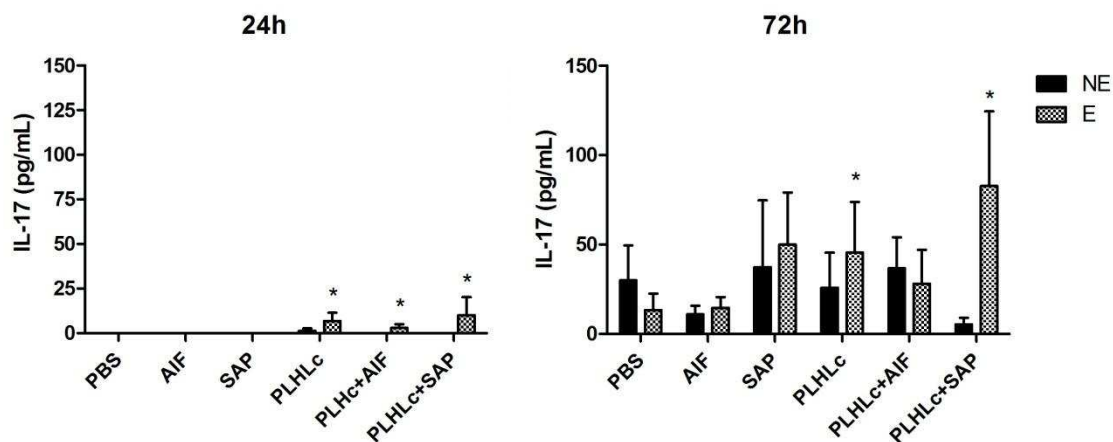


Figura 9: Produção de IL-17 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-17 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de IL-17 por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.5 Produção de IL-6

Em 24 horas foi observado aumento na produção de IL-6 por esplenócitos estimulados dos grupos PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em comparação com a do grupo controle PBS. Porém, em 72 horas, estas diferenças não foram observadas (Figura 10).

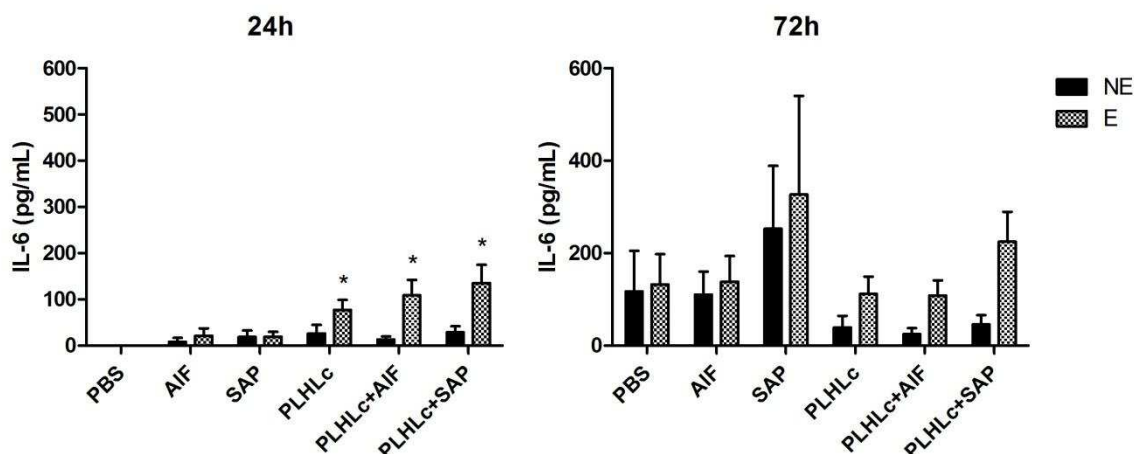


Figura 10: Produção de IL-6 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-6 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com *AgLc* (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de IL-6 por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.6 Produção de IL-10

Esplenócitos dos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP produziram maiores quantidades de IL-10 quando estimulados com *AgLc* (E) em relação às suas respectivas culturas não estimuladas (NE) no período de 24 horas, porém não houve diferença estatística na produção de IL-10 por esplenócitos estimulados dos grupos acima mencionados em comparação com esplenócitos estimulados do grupo controle PBS. Em 72 horas houve aumento na produção de IL-10 por esplenócitos estimulados dos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em relação ao grupo controle PBS estimulado e em relação às suas respectivas culturas não estimuladas (Figura 11).

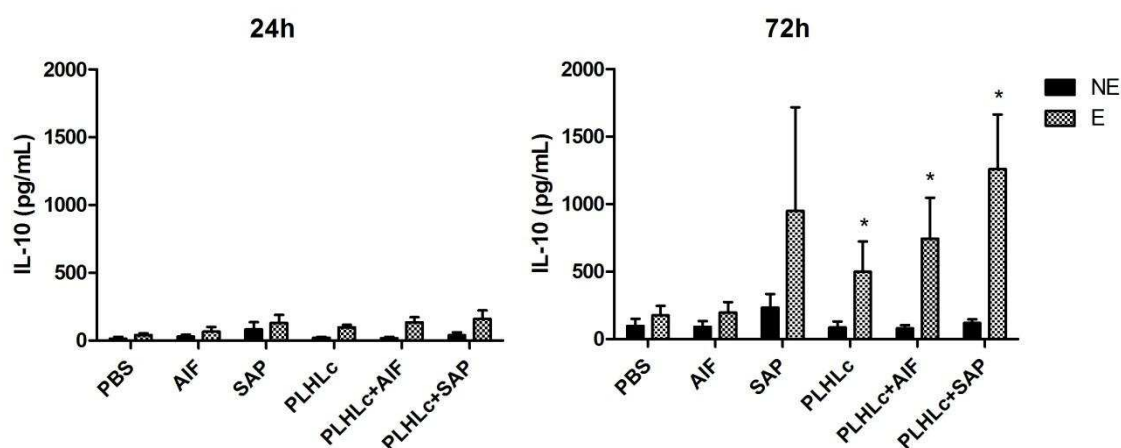


Figura 11: Produção de IL-10 por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-10 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de IL-10 por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

6.2.7 Produção de IL-4

Não foi detectada produção de IL-4 por esplenócitos estimulados com AgLc e esplenócitos não estimulados dos seis grupos avaliados, tanto nos sobrenadantes de cultura coletados com 24 horas como nos sobrenadantes coletados com 72 horas.

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

A produção de NO por células fagocitárias do baço foi avaliada indiretamente pela análise de nitrito em sobrenadante de cultura de esplenócitos dos camundongos dos 6 grupos experimentais estimulados com AgLc (E) ou não estimulados (NE) e coletado com 24 e 72 horas, conforme descrito na metodologia. No

entanto, níveis insignificantes de NO foram detectados pelo método de Griess a partir dos sobrenadantes coletados (Figura 12).

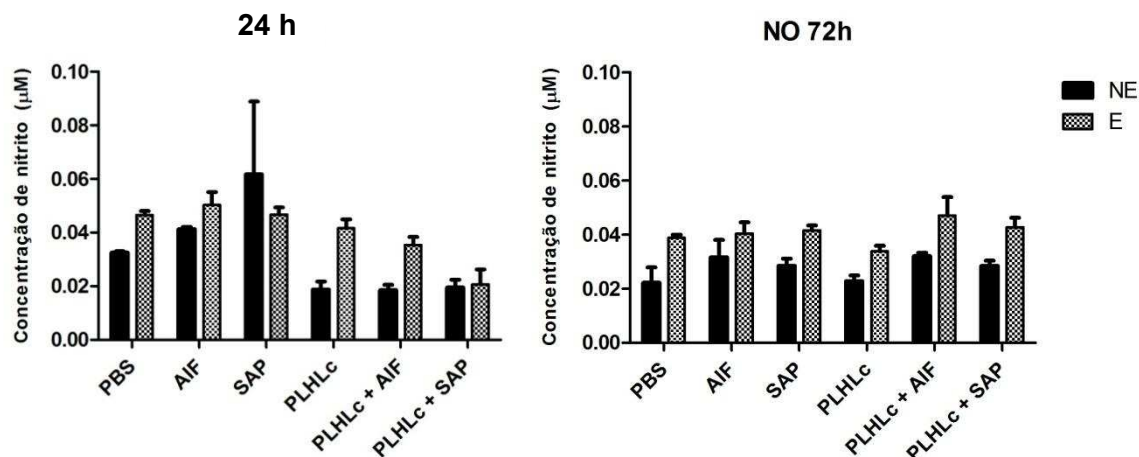


Figura 12: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização com PLHLc associada ou não com adjuvante. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente vacinados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e NO foi dosado indiretamente pela análise de nitrito utilizando o método de Griess em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc (E) ou não estimulados (NE). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças na produção de NO por esplenócitos dos animais dos grupos imunizados em relação à do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste *t* de Student (*p<0,05).

7. Discussão

No presente trabalho a PLHLc foi purificada e utilizada em experimentos de imunização como antígeno vacinal a fim de avaliar seu potencial protetor em camundongos BALB/c infectados com as formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. Para isso, foi realizada quantificação da carga parasitária no baço e no fígado e dosagens de citocinas e óxido nítrico a partir de sobrenadante de cultura de esplenócitos. Alguns autores já caracterizaram a PLH de algumas espécies de *Leishmania* e sua participação em processos de adesão à célula hospedeira (LOVE et al., 1993; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2007; DE CASTRO CÔRTEZ et al., 2012b; DE CASTRO CÔRTEZ et al., 2012a; MARTINS et al., 2015), no entanto, não existem trabalhos que relacionem a participação da PLHLc como estimuladora do sistema imune do hospedeiro e sua utilização como candidata a vacina contra LV.

Os animais imunizados com PLHLc não apresentaram redução da carga de parasitos no baço e no fígado quando comparados com os animais do grupo controle PBS. Esses animais produziram um perfil de resposta Th17 com a produção de IL-6 e IL-17 e produção de IL-10. A ativação da linhagem de células Th17 é induzida pelas citocinas IL-6, IL-23 e TGF- β , e essas células, uma vez ativadas, produzem IL-17, IL-21 e IL-22 (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Em camundongos deficientes de IL-17 e infectados com *L. major*, foi observada exacerbação das lesões na pele, o que sugere a importância da IL-17 produzida por células Th17 na patogênese da LC (LOPEZ KOSTKA et al., 2009). Na LV em humanos, IL-17 e IL-22 estão associadas à proteção contra a reexposição ao parasito, o que sugere a participação da IL-17 na imunidade protetora induzida por vacina (BANERJEE et al., 2016). Em infecção por *L. donovani*, foi observado que IL-17 e IL-22 levam à proteção contra LV, e sugere-se que estas citocinas atuam complementando o papel protetor das citocinas Th1 de modo não dependente (PITTA et al., 2009). Em experimentos de imunogenicidade realizado em nosso laboratório, o grupo de animais que receberam somente a PLHLc apresentou aumento na produção de IFN- γ e IL-10 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc em comparação com os animais do grupo controle (dados não publicados). Porém, de acordo com nossos resultados, a PLHLc sem adição de adjuvante não foi capaz de gerar uma resposta com perfil Th1, apenas Th17 e a citocina reguladora IL-10, o que pode

justificar a não resolução da infecção no baço e no fígado dos animais imunizados com essa formulação vacinal.

Os animais imunizados com PLHLc + AIF apresentaram redução da carga parasitária apenas no baço. Em relação ao perfil esplênico de citocinas, esses animais foram capazes de gerar resposta com perfil Th1 com a produção de IFN- γ e IL-2. Produziram ainda IL-6 e IL-17, citocinas Th17 e a citocina reguladora IL-10. As citocinas proinflamatórias IFN- γ , TNF e IL-2 são produzidas por células Th1 ativadas e são importantes na ativação das vias microbicidas dos macrófagos (FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016b), sendo IFN- γ a principal citocina capaz de maximizar a função leishmanicida dos macrófagos com a indução das vias de produção de NO, essencial para a eliminação das formas amastigotas intracelulares do parasito (RODRIGUES et al., 2016b). TNF além de estar envolvido na ativação de macrófagos, também tem importante participação na formação e manutenção dos granulomas inflamatórios hepáticos responsáveis pelo controle da infecção no fígado (MURRAY et al., 2000). Em aspirado esplênico *ex vivo* de pacientes com LV ativa a neutralização de TNF- α não apresentou efeito direto na replicação do parasito, porém reduziu a produção de IFN- γ , enquanto os níveis de IL-10 permaneceram inalterados (SINGH et al., 2016a). Pacientes com calazar ativo apresentaram altos níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-10 e níveis mínimos de TNF- α , IL-2 e IL-4 (ANSARI et al., 2006). Baixos níveis de IL-2 foi observado em pacientes com LV ativa comparado com pacientes assintomáticos e pacientes curados (COSTA et al., 2012). A IL-10 é uma citocina reguladora que, em níveis elevados, promove a supressão da resposta imune Th1, induzindo a persistência do parasito e a cronificação da doença (DE FREITAS et al., 2016). No entanto, a IL-10 desempenha importante papel na homeostase das respostas imunes proporcionando o estado de equilíbrio do sistema imunológico após a resolução de uma infecção. O aumento dos níveis dessa citocina nos animais imunizados com PLHLc + AIF pode ser uma resposta aos níveis de IFN- γ produzidos por esses animais a fim de evitar possíveis danos ao hospedeiro (GHALIB et al., 1993), e o efeito regulador da IL-10 pode estar associado ao sucesso de uma vacina (STOBER et al., 2005). O uso de adjuvantes, muitas vezes, se faz indispensável na formulação de uma vacina. O AIF inoculado na pele de camundongos promove produção de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-4 e IL-10 (VITORIANO-SOUZA et al., 2012). Nos ensaios prévios de imunogenicidade, o grupo de animais que recebeu PLHLc + AIF apresentou aumento na produção de IFN- γ , IL-4 e

IL-10 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc em relação ao grupo controle, obtendo um perfil misto de resposta Th1/Th2 (dados não publicados). No entanto, na nossa formulação vacinal de PLHLc + AIF não foi registrada produção de IL-4, citocina relacionada ao perfil de resposta Th2, enquanto IL-17 foi produzida em baixos níveis. O mecanismo da participação da IL-17 na mediação de resposta protetora contra LV é praticamente desconhecido. Essa citocina parece contribuir com a migração de neutrófilos e monócitos para o local da infecção (BANERJEE et al., 2016). Na LV, a resposta imune é órgão específica. No fígado os parasitos se multiplicam rapidamente e a carga parasitária atinge seu pico na 2ª a 4ª semana de infecção e o crescimento do parasito só é controlado na 6ª a 8ª semana após a infecção. Em contrapartida, no baço a carga parasitária aumenta intensamente após a 4ª semana e uma infecção crônica se estabelece (FALEIRO et al., 2014). No presente trabalho, os animais foram eutanasiados na 4ª semana após a infecção, período de pico da carga parasitária no fígado e início da intensa proliferação dos parasitos no baço, de acordo com dados não mostrados referentes ao modelo de infecção utilizado em nossos experimentos. Este fato, associado à produção de TNF e IL-17 em níveis insuficientes para proteger os animais contra a proliferação dos parasitos, pode ter contribuído com a manutenção da carga parasitária no fígado dos animais vacinados com PLHLc + AIF.

Quando a PLHLc foi administrada juntamente com o adjuvante Saponina, os animais que receberam essa formulação vacinal apresentaram redução da carga de parasitos tanto no baço quanto no fígado. Os animais desse grupo produziram citocinas com padrão Th1 e Th17, especialmente IFN- γ e IL-17 respectivamente e a citocina reguladora IL-10. Os perfis de resposta Th1 e Th17 são relacionados com proteção contra LV, conforme citado acima, enquanto que o padrão Th2 de resposta contribui com a susceptibilidade e progressão da patologia (DE FREITAS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016). Pitta demonstrou que as citocinas IL-22 e especialmente a IL-17, típicas de um perfil de resposta Th17, estão envolvidas na proteção contra LV e que essas complementam de forma não dependente o desenvolvimento da resposta protetora realizada pelas citocinas de padrão Th1 (PITTA et al., 2009). A IL-17 contribui na mobilização e sobrevivência de neutrófilos no local da infecção (KOLLS; LINDE, 2004) e essas células desempenham importante papel na infecção por *Leishmania*, em especial na formação dos granulomas inflamatórios no fígado de animais infectados (BANERJEE et al., 2016). Camundongos deficientes do receptor de

IL-17 são mais susceptíveis à infecção por *L. infantum* e apresentam menores níveis de IFN- γ e infiltrado inflamatório no fígado. Além do mais, IL-17 atua sinergicamente com IFN- γ para potencializar a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados com a produção de NO, sugerindo a importância de formulações vacinais com a combinação de antígeno/adjuvante capazes de aumentar a produção de IL-17 (NASCIMENTO et al., 2015).

A importância de IFN- γ na proteção contra LV já é bem estabelecida, uma vez que essa citocina atua na ativação das vias microbicidas dos macrófagos para a produção de NO. Na fase de triagem clínica para avaliar a imunogenicidade da vacina Leish-F1+MPL-SE, foi detectada produção de IFN- γ , IL-10 e níveis basais de IL-4, porém a proteção da vacina foi associada aos altos níveis de IFN- γ produzidos (CHAKRAVARTY et al., 2011). A Canileish (LiESP/QA-21), vacina licenciada para a vacinação de cães na Europa, confere proteção por estimular uma resposta imune mediada por células Th1, especialmente com a produção de IFN- γ (MORENO et al., 2012). Em um estudo da expressão de 6 citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) marcadoras de resposta de células T de memória sob estímulo de SLA em humanos, apenas a produção de IFN- γ foi associada aos pacientes curados ou resistentes a LV (KUMAR et al., 2010). Outra citocina de grande importância na infecção por *Leishmania* é a IL-10, uma vez que atua na desativação das vias microbicidas dos macrófagos e ainda diminui a expressão de moléculas co-estimuladoras, MHC e a produção de IFN- γ (RODRIGUES et al., 2016b). Como já mencionado, o efeito regulador da IL-10 nas infecções contribui na homeostase das respostas imunes e seu efeito pode ser essencial na eficácia de uma vacina (GHALIB et al., 1993; STOBER et al., 2005).

O adjuvante saponina tem sido utilizado em diversas formulações vacinais contra leishmaniose por induzir uma intensa resposta imune do tipo Th1 (FERNANDES et al., 2008; BORJA-CABRERA et al., 2008; COSTA et al., 2014; DE JESUS PEREIRA et al., 2015; OLIVA et al., 2014). As duas vacinas atualmente licenciadas no Brasil para a imunização de cães, a Leish-Tec[®] e a Leishmune[®], apresentam saponina em sua formulação. Na avaliação da imunidade protetora conferida pela Leish-Tec[®] frente à infecção por *L. infantum chagasi* em cães beagle, foram avaliados os níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 e foi detectado aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-10 nos animais infectados após a imunização, e a vacina conferiu

42,86% de eficácia de proteção (FERNANDES et al., 2008). A vacinação contra LVC utilizando a vacina Leishmune[®] demonstrou aumento dos níveis de IFN- γ do primeiro ao sexto mês após a vacinação e aumento da expressão de IL-17 no primeiro mês após a infecção, enquanto os níveis de IL-4 e TNF não apresentaram aumento em relação ao controle (MOREIRA et al., 2016). No presente trabalho, a combinação das respostas Th1 e Th17 com a produção respectivamente de IFN- γ e IL-17 e a produção de IL-10 induzidas pela formulação vacinal contendo PLHLc + SAP e ainda, a não produção de IL-4 podem justificar a redução da carga parasitária no baço e no fígado dos animais imunizados com essa vacina.

A IL-4 é uma citocina considerada por muitos autores como supressora da resposta Th1 e indutora de resposta Th2 (FALEIRO et al., 2014). Ela impede a expansão e migração dos neutrófilos para os locais de infecção e inflamação por antagonizar o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e os sinais mediados por receptores de quimiocinas (WOYTTSCHAK et al., 2016). Nas três formulações vacinais avaliadas, PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP não houve produção de IL-4 pelos esplenócitos estimulados e isso pode ser considerado um ponto positivo na busca por proteção contra a LV.

A produção de NO pelos macrófagos é induzida principalmente por IFN- γ , que promove a transcrição da enzima iNOS resultando no controle da proliferação das formas amastigotas intracelulares do parasito (DING et al., 1988). Para avaliar o potencial microbicida de macrófagos ativados nos diferentes grupos imunizados, a produção de NO foi avaliada por intermédio dos níveis de nitrito presente no sobrenadante de culturas de esplenócitos de camundogos imunizados com a PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP após estímulo com AgLc. Apesar do perfil esplênico de citocinas produzidas após o estímulo com AgLc e a redução da carga parasitária observada nos grupos imunizados com PLHLc + AIF e PLHLc + SAP, não houve indução de NO por esplenócitos dos grupos vacinados. Os macrófagos são as principais células da imunidade inata conhecidos por exercer atividades leishmanicidas contra infecção por *L. donovani* por intermédio da produção de iNOS no fígado (BHATTACHARYA; ALI, 2013). No entanto, estudo sugere que os efeitos anti-parasitários dos macrófagos no fígado é independente de iNOS (MURRAY, 2006). Bhattacharya sugere que o controle da infecção por *L. donovani* em macrófagos pode

seguir tanto uma via dependente quanto independente de iNOS o que depende do estágio de infecção (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Outra abordagem interessante em relação à produção de citocinas esplênicas frente ao estímulo com *AgLc* é a cinética dessa produção. No presente trabalho, os sobrenadantes de cultura de esplenócitos foram coletados com 24 e 72 horas após a estimulação e incubação das células. No entanto, podemos observar diferenças na produção das citocinas pelos grupos imunizados com PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP nos dois tempos avaliados. Em relação às citocinas de padrão Th1, foi observado maiores níveis de IL-2 em 24 h. Nesse mesmo tempo, os níveis de TNF provavelmente aproximaram do seu pico de produção, uma vez que em 72 h não foi registrado aumento estatístico comparado com a produção em 24 h.. Já a produção de INF- γ apresentou maiores níveis em 72h. Na infecção assintomática por *L. donovani* macrófagos infectados podem produzir TNF e IL-1 β como parte da resposta imune inata. Por sua vez, DCs produzem IL-12 que ativam os linfócitos T CD4+ específicos ao antígeno que passam produzir INF- γ e TNF. Estas citocinas podem ativar macrófagos infectados a produzirem NO para eliminar os parasitos intracelulares (FALEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016b). Apesar de IL-2 ser uma citocina de padrão Th1, sua participação na infecção por *Leishmania* não é elucidada.

Duas citocinas de padrão Th17 foram avaliadas, IL-6 e IL-17. Em 24 h, IL-6 parece ter aproximado do seu pico de produção, uma vez que em 72 h não foi observado aumento dos níveis dessa citocina em relação à sua produção em 24 h. Já a IL-17 apresentou maiores níveis em 72 h. A diferenciação de células Th(0) em células T CD4+ com padrão Th17 é induzida pelas citocinas IL-6, IL-23 e TGF- β . Uma vez ativadas, essas células passam a produzir IL-21, IL-22 e especialmente IL-17, que atua no controle da infecção juntamente com as citocinas de padrão Th1 (PITTA et al., 2009; BANERJEE et al., 2016). Portanto, os níveis de IL-6 nas primeiras horas após a infecção se faz importante para a produção de IL-17, que irá atuar na migração de neutrófilos para o local da infecção, podendo ainda contribuir na ativação das vias microbidas dos macrófagos.

Os maiores níveis de IL-10 foram registrados em 72 h, enquanto que IL-4, citocina de padrão Th2, não apresentou produção detectável nos períodos avaliados. A produção de IL-10 é requerida para estabelecer o controle da infecção, portanto os altos

níveis dessa citocina em 72 h proporciona um balanço da resposta imune especialmente em relação aos altos níveis de IFN- γ produzidos nesse mesmo período (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Durante a infecção por *L. major*, diferentes citocinas são requisitadas para a indução e manutenção da resposta Th2. IL-10 e IL-5 parecem exercer importante papel nas fases iniciais da infecção, enquanto IL-4 e IL-3 para estabelecer uma resposta Th2 que leva à progressão da doença (NASHED et al., 2000).

A partir da análise dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que a PLHLC isolada não é capaz de proporcionar proteção contra infecção por *L. infantum chagasi*, porém quando associada com um adjuvante foi capaz de produzir perfis de resposta que levaram à redução da carga parasitária dos animais imunizados com PLHLC + AIF e PLHLC + SAP. A PLHLC + SAP foi capaz de conferir maior proteção aos animais desafiados com as formas promastigotas de *L. infantum chagasi* com a redução da carga de parasitos no baço e no fígado, enquanto que a PLHLC + AIF foi capaz de reduzir a carga de parasitos apenas no baço dos animais desafiados. Ambas as formulações vacinais produziram citocinas com padrão de resposta Th1, Th17 e a citocina IL-10. No entanto, os animais vacinados com PLHLC + SAP apresentaram maior média de produção de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-17 e IL-10 que refletiram no efeito biológico de proteção observado.. Os resultados nos fazem otimistas quanto à utilização de PLHLC + SAP como candidata a vacina contra LV e nos levam a continuar na investigação dessa formulação vacinal, agora com a utilização de PLHLC recombinante.

8. Conclusões

- Os animais do grupo imunizado apenas com PLHLc produziram um padrão de resposta imune Th17 com a produção das citocinas IL-6 e IL-17 e a citocina reguladora IL-10 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc. Porém, a resposta imune produzida não foi capaz de reduzir a carga de parasitos no baço e no fígado desses animais quando comparado com os animais do grupo controle PBS.

- No grupo de animais que receberam PLHLc + AIF, foi observada produção de citocinas de padrão de resposta Th1 e Th17 e a citocina IL-10, por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc. No entanto, essa formulação vacinal proporcionou menores médias de produção de citocinas, especialmente IFN- γ , IL-17 e IL-10 comparado com o grupo imunizado com PLHLc + SAP. Os resultados obtidos refletiram na redução da carga parasitária apenas no baço desses animais em comparação com os animais do grupo controle PBS.

- Nos animais do grupo imunizado com PLHLc + SAP, foi observado um padrão de resposta imune Th1/Th17 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc. As citocinas produzidas foram IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17 e a citocina reguladora IL-10. Esse perfil de resposta e os níveis de citocinas produzidas foram capazes de proporcionar a redução da carga parasitária no baço e no fígado dos animais que receberam essa formulação vacinal em comparação com os animais do grupo controle.

- Não houve produção detectável de IL-4 por esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc tanto provenientes dos grupos controles quanto dos grupos PLHLc, PLHLc + AIF e PLHLc + SAP em 24 e 72 horas de incubação. Isso pode ser considerado um ponto positivo na busca por uma proteção contra LV.

- Apesar da resposta imune produzida pelos grupos imunizados com PLHLc + AIF e especialmente PLHLc + SAP, resultando na redução da carga parasitária no baço e no baço/fígado, respectivamente, não foi observado produção de NO utilizando a reação de Griess a partir do sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc.

- Em relação à cinética de produção de citocinas pelos esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc, foi observado que, em 24 horas há pico de produção de IL-2, TNF e IL-6, enquanto que em 72 horas há pico de produção de IFN- γ e IL-10.
- Os níveis de citocinas de perfil de resposta Th1/Th17 com especial produção de IFN- γ e IL-17 respectivamente, e a produção de IL-10 proporcionado pela imunização com PLHLc + SAP, foi mais eficaz no controle da LV nos animais infectados por *L. infantum chagasi*, uma vez que foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço e no fígado desses animais. Esses resultados nos conduzem para uma nova etapa na investigação da PLHLc como candidata a vacina contra LV por intermédio de ensaios de imunogenicidade e proteção utilizando a proteína recombinante no preparo da formulação vacinal.

9. Perspectivas de estudo

Vários trabalhos na literatura nos mostram que uma resposta imunológica capaz de gerar proteção contra a LV pode ser obtida tanto por uma via Th1 quanto por uma via mista Th1/Th2. Nossos resultados demonstraram que a PLHLc administrada com o adjuvante Saponina pode se tornar uma promissora candidata à vacina contra LV. Essa formulação vacinal proporcionou uma resposta imune via Th1/Th17/IL-10, que culminou na redução da carga parasitária nos dois órgãos avaliados. Sabendo que a utilização de proteína nativa do parasito como imunógeno limita a produção de uma vacina, se faz necessário investigar a utilização da PLHLc recombinante em testes de imunogenicidade e proteção. Nesse sentido, o trabalho permite propor as seguintes perspectivas:

- Avaliar a imunogenicidade conferida pela rPLHLc isolada ou na presença de adjuvante por intermédio da realização de ensaio de linfoproliferação, dosagem de citocinas, NO e isotipos de anticorpos IgG1/IgG2a.
- Avaliar a eficácia vacinal da rPLHLc isolada ou na presença de adjuvante por meio da quantificação do parasitismo no baço e no fígado, bem como o perfil esplênico de citocinas por citometria de fluxo, dosagem de NO e isotipos de anticorpos IgG1/IgG2a após infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*.
- Estudar possíveis formulações vacinais que combinem a rPLHLc com uma ou mais proteínas recombinantes de *L. infantum chagasi* implicadas no processo de adesão e infecção à célula hospedeira.

10. Considerações finais

Se tratando de leishmanioses e demais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), longa tem sido a busca por medidas eficazes de controle e erradicação por parte de vários grupos de pesquisas em todo o mundo. Em 2015, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia foi concedido aos cientistas William C. Campbell e Satoshi Omura pelo desenvolvimento de novas terapias para o combate de doenças causadas por vermes nematódeos e, ainda, para a chinesa Youyou Tu, por desenvolver uma nova terapia contra malária. O destaque e a importância que tal prêmio representa para a comunidade científica talvez tenha despertado no mundo um novo olhar para as DTNs, ou, pelo menos, é o que esperamos. A elevada incidência de LV especialmente em populações mais pobres e seu índice de letalidade levou a Organização Mundial de Saúde a delinear uma proposta na tentativa de reduzir drasticamente os encargos associados à doença. O plano proposto estima identificar e tratar todos os casos de LV das regiões endêmicas das Américas, África e Europa e reduzir para abaixo 1 a cada 10.000 casos a prevalência da doença no subcontinente Indiano até o ano de 2020. Tal plano exige medicamentos eficazes e acessíveis (WHO, 2013). Dados os desafios implicados ao uso dos medicamentos disponíveis até o momento, a imunoprofilaxia continua sendo uma abordagem em potencial para o controle da LV e, portanto, requer atenção e investimentos.

11. Referências bibliográficas

AKHOUNDI, M, KUHL, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016a.

AKHOUNDI, M. KUHL, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., SERENO, D. Correction: A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016b.

ALVAR, J. VÉLEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDRADE, A. F. B.; SARAIVA, E. M. B. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 85, n. 7, p. 576–581, 1999.

ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 339–345, 2006.

AZEVEDO-PEREIRA, R. L. PEREIRA, M.C.S., OLIVEIRA-JUNIOR, F.O.R., BRAZIL, R.P., CÔRTEZ, L.M.C., MADEIRA, M.F., SANTOS, A.L.S., TOMA, L., ALVES, C. R. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 234–239, 2007.

BANERJEE, A. BHATTACHARYA, P., JOSHI, A. B., ISMAIL, N., DEY, R., NAKHASI, H.L. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, p. 6–10, 2016.

BARATA, R. A. PEIXOTO, J.C., TANURE, A., GOMES, M.E., APOLINÁRIO, E.C., BODEVAN, E.C., DE ARAÚJO, 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 Research International**, v. 2013, 2013.

BELO, V. S. WERNECK, G.L., BARBOSA, D.S., SIMÕES, T.C., NASCIMENTO, B.W.L., DA SILVA, E. S., STRUCHINER, C.J. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 4, p. e2182, 25 abr. 2013.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1003–1015, 2008.

BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 6, p. 619–634, 2015.

BORJA-CABRERA, G. P. SANTOS, F.N., BAUER, F.S., PARRA, L.E., MENZ, I., MORGADO, A.A., SOARES, I.S., BATISTA, L.M.M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 26, n. 39, p. 4991–4997, 2008.

CELIO, M.; MARZOCHI, D. A. Editorial Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. April, p. 147–149, 2016.

CHAKRAVARTY, J. KUMAR, S., TRIVEDI, S., RAI, V.K., SINGH, A., ASHMAN, J.A., LAUGHLIN, E.M., COLER, R.N., KAHN, S.J., BECKMANN, A.M., COWGILL, K.D., REED, S.G., SUNDAR, S., PIAZZA, F.M. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 2011.

CHAMAKH-AYARI, R. BRAS-GOLÇALVES, R., BAHI-JADER, N., PETITDIDIER, E., MARKIKOU-OUNI, W., AOUN, K., MORENO, J., CARRILLO, E., SALOTRA, P., KAUSHAL, H., NEGI, N.S., AREVALO, J., FALCONI-AGAPITO, F., PRIVAT, A., CRUZ, M., PAGNIEZ, J. PAPIEROK, G.M., RHOUMA, F.B.H., TORRES, P., LEMESRE, J.L., CHENIK, M., MEDDEB-GARNAOUI, A. In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

COSTA, A. S. A. COSTA, G.C., DE AQUINO, D.M.C., DE MENDONÇA, V.R.R., BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., CALDAS, A.J.M. Cytokines and visceral leishmaniasis: A comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012.

COSTA, L. E. GOULART, L.R., PEREIRA, N.C.J., LIMA, M.I.S., DUARTE, M.C., MARTINS, V.T., LAGE, P.S., MENEZES-SOUZA, D., RIBEIRO, T.G., MELO, M.N., FERNANDES, A.P., SOTO, M., TAVARES, C.A.P., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., COELHO, E.A.F. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110014, 15 out. 2014.

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.

DANTAS-TORRES, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 929–930, 2006.

DE CASTRO CÔRTEZ, L. DE SOUZA PEREIRA, M.C., DA SILVA, F., PEREIRA, B.A., DE OLIVEIRA JUNIOR, F., DE ARAÚJO SOARES, R., BRAZIL, R., TOMA, L., VICENTE, C., NADER, H., DE FÁTIMAMADEIRA, M., BELLO, F.J., ALVES, C. 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*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 142, 2012a.

DE CASTRO CÔRTEZ, L. M. DE SOUZA PEREIRA, M.C., DE OLIVEIRA, F.O.R., CORTE-REAL, S., DA SILVA, F.S., PEREIRA, B.A.S., DE FÁTIMA MADEIRA, M., DE MORAES, M.T.B., BRAZIL, R., ALVES, C.R. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. **Parasitology**, v. 139, n. 2, p. 200–7, 2012b.

DE FREITAS, E. O. LEORATTI, F.M.S., FREIRE-DE-LIMA, C.G., MORROT, A., FEIJÓ, D. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2016.

DE JESUS PEREIRA, N. C. RÉGIS, W.C.B., COSTA, L.E., DE OLIVEIRA, J.S., DA SILVA, A.G., MARTINS, V. T., DUARTE, M.C., DE SOUZA, J.R.R, LAGE, P.S., SCHENEIDER, M.S., MELO, M.N., SOTO, M., SOARES, S.A., TAVARES, C.A.P., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., COELHO, E.A.F. Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 180–190, 2015.

DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 1–6, 2015.

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.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DUTHIE, M. S., FAVILA, M., HOFMEYER, K.A., TUTTERROW, Y.L., REED, S.J., LAURENCE, J.D., PICONE, A., GUDERIAN, J., BAILOR, H.R., VALLUR, A.C., LIANG, H., MOHAMATH, R., VERGARA, J., HOWARD, R.F., COLER, R.N., REED, S.G. Strategic evaluation of vaccine candidate antigens for the prevention of Visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 25, p. 2779–2786, 2016.

FALEIRO, R. J. KUMAR, R., HAFNER, L.M., ENGWERDA, C.R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FERNANDES, A. P. COSTA, M.M.S., COELHO, E.A.F., MICHALICK, M.S.M., DE FREITAS, E., MELO, M.N., LUIZ TAFURI, W., RESENDE, D.M., HERMONT, V., ABRANTES, C.F., GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.

FIROUZMAND, H., BADIEE, A., KHAMESIPOUR, A., HERAVI, SHARGH, V., ALAVIZADEH, S.H., ABBASI, A., JAAFARI, M.R. Induction of protection against leishmaniasis in susceptible BALB/c mice using simple DOTAP cationic nanoliposomes containing soluble *Leishmania* antigen (SLA). **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 528–535, 2013.

FREITAS, V. C., PARREIRAS, K.P., DUARTE, A.P.M., SECUNDINO, N.F.C., PIMENTA, P. F.P. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606–612, 2012.

GARCÍA, M. A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L.; VANCELL, R. L. *Entamoeba histolytica*: Adhesins and lectins in the trophozoite surface. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2802–2815, 2015.

GHALIB, H. W., PIUVEZAM, M.R., SKEIKY, Y.A.W., 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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 324–329, 1993.

GILLESPIE, P. M., BEAUMIER, C.M., STRYCH, U., HAYWARD, T., HOTEZ, P.J., BOTTAZZI, M.H. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, jun. 2016.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.

GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 94–100, 2015.

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

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HANDLER, M. Z., PATEL, P.A., KAPILA, R., AL-QUBATI, Y., SCHWARTZ, R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.

HENDRICKX, S., INOCÊNCIO DA LUZ, R.A., BHANDARI, V., KUYPERS, K., SHAW, C.D., LONCHAMP, J., SALOTRA, P., CARTER, K., SUNDAR, S., RIJAL, S., DUJARDIN, J.C., COS, P., MAES, L. Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: Outcome dependent on in vitro selection protocol. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1–7, 2012.

HERAVI SHARGH, V., JAAFARI, M.R., KHAMESIPOUR, A., JALALI, S.A., FIROUZMAND, H., ABBASI, A., BADIEE, A. Cationic liposomes containing soluble *Leishmania* antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 105–114, 2012.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

JOSHI, J.; MALLA, N.; KAUR, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014.

KATO, K., YAHATA, K., GOPAL DHOUBHADEL, B., FUJII, Y., TACHIBANA, H. Novel hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 13901, 2015.

KAUR, T.; SOBTI, R. C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 2, p. 95–103, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KOLLS, J. K.; LINDE, A. Interleukin-17 Family Members. **Immunity**, v. 21, p. 467–476, 2004.

KOMATH, S. S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 4, n. 6, p. 973–988, 2006.

KUMAR, R., GOTO, Y., GIDWANI, K., COWGILL, K.D., SUNDAR, S., REED, S.G. Evaluation of Ex Vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 808–813, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, Academic Press, London, p. 1-120, 1987.

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.

LARA-SILVA, F. DE O., MICHALSKY, E.M., FORTES-DIAS, C.L., FIUZA, V. O.P., PESSANHA, J.E.M., REGINA-SILVA, S., DE AVELAR, D.M., SILVA, M.A., LIMA, A.C.V.M.R., DA COSTA, A.J.A., MACHADO-COELHO, G., L.L., DIAS, E.S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 2015.

LEAL, J. M., MOSQUINE, M., COVRE, L.P., STAGMILLER, N.P., RODRIGUES, R.R., CHRISTENSEN, D., GUEDES, H.L.M., ROSSI-BERGMANN, B., GOMES, D.C.O. Intranasal vaccination with killed *Leishmania amazonensis* promastigotes antigen (LaAg) associated with CAF01 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice challenged with *Leishmania (infantum) chagasi*. **Parasitology**, v. 142, n. 13, p. 1640–1646, 2015.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.-L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 144, 2016.

LOPEZ KOSTKA, S., DINGES, S., GRIEWANK, K., IWAKURA, Y., UDEY, M.C., VON, STEBUT, E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 3039–46, 2009.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 3, p. 759–766, 1993.

LOWRY, OLIVER H.; ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MARKOVIC, S. N.; MURASKO, D. M. Anesthesia inhibits poly I:C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 56, n. 2, p. 202–209, 1990.

MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E.A.F., GOMES, D.C.O., VILELA, M.C., MASIOLI, C.Z., TAVARES, C.A.P., FERNANDES, A.P., AFONSO, L.C.C., REZENDE, S.A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitology Research**, v. 98, n. 1, p. 67–74, 2005.

MARTÍNEZ SALAZAR, M. B., DELGADO DOMÍNGUEZ, J., SILVA ESTRADA, J., GONZÁLEZ, B., C., BECKER, I. Vaccination with *Leishmania mexicana* LPG induces PD-1 in CD8+ and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: A model to assess vaccine efficacy. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1259–1265, 2014.

MARTINS, T. V. F., DE CARVALHO, T, V., DE OLIVEIRA, C.V.M., DE PAULA, S.O., CARDOSO, S.A., DE OLIVEIRA, L.L., MARQUES-DA-SILVA, E. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 34–43, 2015.

MCGREAL, E. P.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 11 SPEC. ISS., p. 1109–1121, 2004.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEHEUS, F., BALASEGARAM, M., OLLIARO, P., SUNDAR, S., RIJAL, S., FAIZ, M.A., BOELAERT, M. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

MICHALSKY, É. M., FORTES-DIAS, C.L., FRANÇA-SILVA, J.C., ROCHA, M.F., BARATA, M.A., DIAS, E.S. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1191–1193, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. n. 27, p. 120, 2006.

MOREIRA, M. L., COSTA-PEREIRA, C., ALVES, M. L.R., MARTELETO, B.H., RIBEIRO, V.M., PERUHYPE-MAGALHÃES, V., GIUNCHETTI, R.C., MARTINS-FILHO, O.A., ARAÚJO, M.S.S. Vaccination against canine leishmaniasis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 33–45, 2016.

MORENO, J., VOULDOUKIS, I., MARTINS, V., McGAHIE, D., CUISINIER, A.M., GUEGUEN, S. Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates an appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

MURRAY, H. W., JUNGBLUTH, A., RITTER, E., MONTELIBANO, C., MARINO, M.W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6289–93., 2000.

MURRAY, H. W. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1013–5, 2006.

MUTISO, J. M., MACHARIA, J.C., KIO, M.N., ICHAGICHU, J.M., RIKOI, H., GICHERU, M.M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **Journal of biomedical research**, v. 27, n. 2, p. 85–102, mar. 2013.

NASCIMENTO, M. S. L., CARREGARO, V., LIMA-JÚNIOR, D.S., COSTA, D.L., RYFFEL, B., DUTHIE, M.S., DE JESUS, A., DE ALMEIDA, R.P., DA SILVA, J.S. Interleukin 17A acts synergistically with interferon- γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015.

NASHED, B. F., MAEKAWA, Y., TAKASHIMA, M., ZHANG, T., ISHII, K., DAINICHI, T., ISHIKAWA, H., SAKAI, T., HISAEDA, H., HIMENO, K. Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1435–1443, 2000.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, n. 1-3, p. 205–223, 1996.

NIETO, A., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R., MADRID-ELENA, N., CARRIN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NOAZIN, S., MODABBER, F., KHAMESIPOUR, A., SMITH, P.G., MOULTON, L.H., NASSERI, K., SHARIFI, I., KHALIL, E.A.G., BERNAL, I.D.V., ANTUNES, C.M.F., KIENY, M.P., TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759–6767, 2008.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 202, n. 3, p. 425–35, 2014.

OLIVA, G., NIETO, J., FOGLIA MANZILLO, V., CAPPIELLO, S., FIORENTINO, E., DE MUCCIO, T., SCALONE, A., MORENO, J., CHICHARRO, C., CARRILLO, E., BUTAUD, T., GUEGAND, L., MARTIN, V., CUISINIER, A.M., McGAHIE, D., GUEGUEN, S., CAÑAVATE, C., GRADONI, L. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

OLIVEIRA, F. O. R. DE., ALVES, C.R., CALVET, C.M., TOMA, L., BOUÇAS, R.I., NADER, H.B., CASTRO CÔRTEZ, L.M. DE., KRIEGER, M.A., MEIRELLES, M.N.S.L., SOUZA PEREIRA, M.C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 329–338, 2008.

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

n. 06, p. 735–743, 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.; BORJACABRERA, 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.

PEREIRA, L., ABBEHUSEN, M., TEIXEIRA, C., CUNHA, J., NASCIMENTO, I.P., FUKUTANI, K., DOS-SANTOS, W., BARRAL, A., DE OLIVEIRA, C.I., BARRAL-NETTO, M., SOTO, M., BRODSKYN, C.I. Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

PITTA, M. G. R., ROMANO, A., CABANTOUS, S., HENRI, S., HAMMAD, A., KOURIBA, B., ARGIRO, L., EL KHEIR, M., BUCHETON, B., MARY, C., EL-SAFI, S.H., DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PRADO, P. F. DO, ROCHA, M.F., SOUSA, J.F.DE, 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561–566, 2011.

PRESS, D. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients : meta- analysis and systematic review. p. 75–81, 2016.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REGINA-SILVA, S., FERES, A.M.L.T., FRANÇA-SILVA, J.C., DIAS, E.S., MICHALSKY, E.M., DE ANDRADE, H.M., COELHO, E.A.F., RIBEIRO, G.M., FERNANDES, A.P., MACHADO-COELHO, G.L.L. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–9, 2016.

RODRIGUES, A. C. M., MELO, L.M., MAGALHÃES, R.D., DE MORAES, N.B., DE SOUZA JÚNIOR, A.D., BELIVAQUA, C.M.L. Molecular identification of *Lutzomyia*

migonei (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 28–32, 2016a.

RODRIGUES, V., CORDEIRO-DA-SILVA, A., LAFORGE, M., SILVESTRE, R., ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 2016b.

SATO, S., BHAUMIK, P., ST-PIERRE, G., PELLETIER, I. Role of Galectin-3 in the Initial Control of *Leishmania* Infection. **Critical Reviews in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 577–579, 2006.

SINGH, N., KUMAR, R., ENGWERDA, C., SACKS, D., NYLEN, S. Tumor necrosis factor alpha neutralization has no direct effect on parasite burden, but causes impaired IFN- γ production by spleen cells from human visceral. **Cytokine**, v. 85, p. 184–190, 2016a.

SINGH, O. P., STOBBER, C.B., SINGH, A.KR., BLACKWELL, J.M., SUNDAR, S. Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

SINGH, R. S., WALIA, A.K., KANWAR, J.R., KENNEDY, J.F. Amoebiasis vaccine development: A snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 258–268, 2016b.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KANWAR, J. R. Protozoa lectins and their role in host–pathogen interactions. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1018–1029, 2016.

SINHA, S., SUNDARAM, S., SINGH, A.P., TRIPATHI, A. A gp63 based vaccine candidate against Visceral Leishmaniasis. **Bioinformatics**, v. 5, n. 8, p. 320–325, 2011.

SRIVASTAVA, S., SHANKAR, P., MISHRA, J., SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

STOBER, C. B., LANGE, U.G., ROBERTS, M.T.M., ALCAMI, A., BLACKWELL, J.M. IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2517–2524, 2005.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787–1796, 2009.

SUNDAR, S., SINGH, A., RAI, M., PRAJAPATI, V.K., SINGH, A.K., OSTYN, B., BOELAERT, M., DUJARDIN, J.C., CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 345-352, 2006.

TITUS, R. G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 5, p. 545-555, 1985.

TORRES, M. D. M., ARIADNE, D., PAULA, J.DE, NAKAZATO, L., PESCADOR, C.A. Hemostatic assessment of dogs associated with hepatic parasite load of *Leishmania infantum chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2961, p. 1–4, 2015.

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

VIANNA, E. N., HELENA, M., MORAIS, F., SABROZA, P.C., REIS, I.A., DIAS, E.S. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302–310, 2016.

VITORIANO-SOUZA, J., MOREIRA, N. DAS D., TEIXEIRAS-CARVALHO, A., CARNEIRO, C.M., SIQUEIRA, F.A.M., DE VIEIRA, P.M.A., GIUNCHETTI, R.C., DE MOURA, S.A.L., 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, n. 7, 2012.

WERNECK, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil : end of a cycle ? **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 32, n. VI, p. 1–2, 2016.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, n. 47, p. 521–540, 2016.

WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Second WHO report on neglected tropical diseases**, v. 3.9, p. 67–71, 2013.

WOYTSCHAK, J., KELLER, N., KRIEG, C., IMPELLIZZIERI, D., THOMPSON, R.W., WYNN, T.A., ZINKERNAGEL, A.S., BOYMAN, O. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 172–184, 2016.

ZUBEN, A. P. B. VON, DONALÍSIO, M.R., ZUBEN, A.P.B.VON. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p. 1–11, 2016.

ZUO, X., DJORDJEVIC, J.T., BIJOSONO OEI, J., DESMARINI, D., SCHIBECI, S.D., JOLLIFFE, K.A., SORREL, T.C. Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast via Cox9p in cytochrome c oxidase. **Molecular pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 476–85, 2011.