

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**“Análise da imunogenicidade e eficácia empregando-se as
vacinas LBSap, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] em uma plataforma
de testes *in vivo*”**

Ludmila Zanandreis de Mendonça

Ouro Preto, MG

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Análise da imunogenicidade e eficácia empregando-se as vacinas LBSap, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] em uma plataforma de testes *in vivo*”

Ludmila Zanandreis de Mendonça

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti – Laboratório de Biologia das Interações Celulares (ICB/UFMG) e Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP).

Co-Orientadores:

Prof. Alexandre Barbosa Reis – Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP)
Dr^a. Denise da Silveira Lemos Giunchetti – Laboratório de Imunogenômica de Parasitos (ICB/UFMG).

Ouro Preto, MG

2013

M539a Mendonça, Ludmila Zanandreis de.

Análise da imunogenicidade e eficácia empregando-se as vacinas LBSap, Leishmune®, Leish-Tec® em uma plataforma de testes *in vivo* [manuscrito] / Ludmila Zanandreis de Mendonça. - 2013.

97f.: il., color.; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti.

Coorientadores: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Profª Drª Denise Lemos Giunchetti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Processos e
ao Tratamento de Doenças.

1. Vacinas - Teses. 2. Imunoparasitologia - Teses. 3. Parasitologia - Teses.
4. Leishmaniose visceral - Teses. 5. Leishmania chagasi - Teses. I. Giunchetti,
Rodolfo Cordeiro. II. Reis, Alexandre Barbosa. III. Giunchetti, Denise Lemos.
IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU: 616.993.161:615.371

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Análise da imunogenicidade e eficácia empregando-se as vacinas LBSap, Leishmune®, Leish-Tec® em uma plataforma de testes in vivo"

Aos doze dias do mês de março de 2013, às 14h00min, na Sala de Multimídia do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Ludmila Zanandreis de Mendonça**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR** a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Presidente

Profa. Dra. Paula Mello de Luca
Examinadora (FIOCRUZ/RJ)

Profa. Dra. Marta de Lana
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 12/03/2013

Ms. Bruno Mendes Roatt ¹
Ms. Lucilene Aparecida Resende ^{1,4}
Ms. Mariana Ferreira Lanna ^{1,4}
Renata Alves de Oliveira e Castro ³
Ms. Rodrigo Dian O. A. Soares ¹
Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau ⁴
Dr. Márcio Sobreira Araújo ⁶
Dr. Olindo Assis Martins Filho ⁵
Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira ⁶
Dra. Sandra Aparecida de Lima Moura ²
Dra. Simone Aparecida Resende ³
Dra. Walderez Ornelas Dutra ⁴

1 - Laboratório de Imunopatologia e 2 - Laboratório de Imunoparasitologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

3 - Laboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

4 - Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

5 - Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

6 - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Edital de Demanda Universal 01/2012 da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo APQ-01698-12. Projeto: Análise comparativa de imunogenicidade e eficácia empregando-se o candidato vacinal KMP-11 e as vacinas LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] em uma plataforma de testes *in vivo*;

Edital Universal 14/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) - Processo 482249/2012-9. Projeto: Estabelecimento da plataforma de testes destinada aos ensaios pré-clínicos vacinais contra leishmanioses;

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte, Minas Gerais;

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) – Ouro Preto, Minas Gerais.

Dedico este trabalho em especial ao meu pai, Nilton; a minha mãe, Denise (in memoriam); a minha irmã, Larissa; a minha avó, Guilhermina e as minhas tias.

*“Ele faria da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sono uma ponte,
da procura um encontro”*
Fernando Sabino

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me iluminar a cada dia, pela saúde, por me dar força nos momentos de fraqueza e me fazer acreditar em dias melhores e crer que todo esforço vale a pena. Gostaria também de agradecer as pessoas que fizeram parte desta história:

A minha família: meu pai que nunca poupou esforços para me ajudar e nesta caminhada esteve sempre do meu lado me dando apoio. Ele foi e está sendo o melhor pai que eu poderia ter. A minha mãe que sempre foi meu exemplo de superação, força e de pessoa. Sei que ela me iluminou em todas as situações que enfrentei neste período e estará sempre presente em meus pensamentos. A minha irmã que tanto me aconselhou, me deu apoio, carinho e puxões de orelha quando foi preciso. A minha avó que me ajudou nesta caminhada, nunca poupou esforços para me ver bem, sempre me ouviu e me apoiou em minhas decisões. Agradeço as minhas tias: Mônica, Gaida, Terezinha, Luisa e Silvana por estarem sempre tão presentes e pela constante preocupação com meu bem estar. Agradeço também minhas primas Mariana e Giovana e a todos os meus familiares. Minha família foi e sempre será o meu alicerce;

A Lucilene e a Mariana, que tanto me ajudaram nos experimentos. Vocês foram fundamentais para a execução deste projeto. Obrigada pelo apoio, conselhos e momentos que nunca serão esquecidos, serei eternamente grata a vocês;

A Aline, Natália e Gleise por tornarem esta caminhada mais leve, me fazendo ver a vida de outro ponto de vista, me ajudando nos momentos difíceis e me fazendo rir nos momentos de descontração;

Ao Kelvinson por estar sempre disposto a ajudar e pelos momentos agradáveis;

A Carolzinha, pela solidariedade, apoio e amizade;

Ao Rodrigo e Bruno que me ajudaram em diversas etapas deste projeto, estavam sempre dispostos a tirar uma dúvida, discutir sobre os experimentos;

A Denise, por me ajudar nos experimentos de citometria, na redação da dissertação e pelo exemplo de profissionalismo, conselhos e paciência;

A Erica, Lilian e a todos os funcionários do biotério, que ajudaram na manutenção dos camundongos e sempre estiveram dispostos a nos ajudar;

Ao Josino e a todos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, por estarem sempre dispostos a nos atender e ajudar no que for preciso;

A minha amiga Ana Claudia. Sem ela este mestrado não teria acontecido, obrigada por me acolher em Ouro Preto e pela amizade;

A Renata Rocha, por me ajudar com os hemogramas;

A Tânia por estar sempre disposta a nos ajudar e por me ensinar como trabalhar nas normas de biossegurança;

A Renata e a Simone pela ajuda na parte experimental;

Ao Maurício pelos conselhos, ajuda e momentos agradáveis;

Agradeço ao João, Wendel, Diego, Paula, Jamille, Flávia, Fernando, Levi, Ana, Rory, Kátia, Juliana, Henrique, Maria Alice, Marina, Sandra, Leoneide, Laser, Dani, Maria e a todos que de alguma forma me auxiliaram nesta caminhada;

Aos professores da Pós-Graduação: Luís, Denise, Simone, Teresinha, Marta, André, Evandro e Riva pelos ensinamentos compartilhados;

Ao Alexandre, co-orientador deste projeto, pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do LIMP;

Ao Rodolfo por tamanho ensinamento, por me fazer amadurecer tanto como pessoa como profissionalmente. Agradeço pela oportunidade, pela paciência e por tudo que ele fez por mim. Ele é um exemplo de pesquisador, sempre ético, profissional e solícito aos seus alunos.

Índice

Lista de figuras.....	XI
Lista de diagrama e tabelas	XII
Lista de abreviaturas e siglas	XIII
Resumo	XV
Abstract.....	XVI
1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais relacionados à <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	2
2. Revisão de Literatura	6
2.1 Fatores imunológicos relacionados a leishmaniose visceral murina	7
2.2 Modelos experimentais para vacinas anti-LV.....	9
2.3 Adjuvantes em vacinas anti-leishmaniose visceral em modelos experimentais...	11
2.4 Estratégias imunoproláticas anti-leishmaniose visceral em modelos experimentais	12
3. Justificativa	19
4. Objetivos.....	21
4.1 Objetivo Geral.....	22
4.2 Objetivos Específicos	22
5. Animais, Material e Métodos.....	23
5.1 Desenho experimental.....	25
5.2 Grupos experimentais e imunobiológicos empregados	25
5.3 Avaliação da inocuidade dos imunobiológicos	27
5.4 Desafio experimental	27
5.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	30
5.6 Imunofenotipagem, <i>ex vivo</i> , de leucócitos circulantes, por citometria de fluxo...	30
5.6.1 Estudo do perfil imunofenotípico <i>ex vivo</i> de leucócitos circulantes.....	31
5.6.2 Análise, <i>ex vivo</i> , do fenótipo celular de leucócitos circulantes, por citometria de fluxo	32
5.7 Análise Quantitativa da Carga Parasitária por <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>	34
5.7.1 Extração do <i>Deoxyribonucleic acid</i> (DNA) de amostras de tecidos.....	34
5.7.2 Construção de curvas-padrão para qPCR e reação de qPCR.....	34
5.8 Análises estatísticas	36
6. Resultados.....	37

6.1 Avaliação do local de inóculo, comportamento e peso dos animais vacinados....	38
6.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	38
6.3 Estudo do perfil imunofenotípico <i>ex vivo</i> de leucócitos circulantes.....	40
6.4 Quantificação da carga parasitária tecidual por qPCR	44
6.5 Resumo dos Resultados	46
7. Discussão	47
8. Conclusões	57
9. Perspectivas	59
10. Referências Bibliográficas	61
11. Anexo.....	78

Lista de figuras

- Figura 1:** Análise da imunofenotipagem de leucócitos circulantes, pelo *software* Flow-Jo, para avaliação da população de linfócitos totais e suas subpopulações; células NK e monócitos..... 33
- Figura 2:** Perfil hematológico de leucócitos circulantes de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap em diferentes tempos: T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após a infecção por *L. chagasi*..... 39
- Figura 3:** Percentual de leucócitos circulantes, obtidos através da imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após a infecção experimental por *L. chagasi*. 43
- Figura 4:** Percentual da razão dos valores de linfócitos T CD3⁺ e de linfócitos B CD19⁺; e valores da razão dos valores de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após a infecção experimental por *L. chagasi*..... 43
- Figura 5:** Quantidade de amastigotas por miligrama de tecido do baço e do fígado de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. A análise foi realizada 30 dias após o desafio experimental com *L. chagasi*..... 45

Lista de diagrama e tabelas

Diagrama 1: Esquema do desenho experimental para avaliação de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec [®] (LT), Leishmune [®] (LM) e LBSap. T0=Tempo antes da 1 ^o imunização, T1=14 dias após a 3 ^o imunização; T2=30 dias após o desafio com <i>L. chagasi</i> 29
Tabela 1: Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para imunofenotipagem das populações celulares..... 31
Tabela 2: Resumo dos principais resultados obtidos 14 dias após as 3 doses de imunização (T1), trinta dias após o desafio experimental com <i>L. chagasi</i> (T2), bem como a avaliação da carga parasitária por qPCR..... 46

Lista de abreviaturas e siglas

APC – Aloficocianina	FACS – <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
BCG – <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	FITC – Isotiocianato de fluoresceína
BSA – Albumina sérica bovina	FL1 – Canal para leitura da Fluorescência do tipo 1 (FITC)
C – Grupo controle	FL3 – Canal para leitura da Fluorescência do tipo 3 (PE-Cy5)
CD – <i>Cluster of differentiation</i>	FL4 – Canal para leitura da Fluorescência do tipo 4 (APC)
CD14 – Marcador de superfície celular de monócitos	FML – <i>Fucose-mannose ligant</i>
CD19 – Marcador de superfície celular de linfócitos B	FSC – <i>Forward Scatter</i> (Tamanho celular)
CD21 – Marcador de superfície celular de linfócitos B de cães	GAPD – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
CD21 – Marcador de superfície celular de linfócitos B em cães	HEL – Lisozima de Clara de Ovo
CD3 – Marcador de superfície celular de linfócitos T totais	i.p. – via intraperitoneal
CD4 – Marcador de superfície celular de linfócitos T auxiliares	IFN- γ – Interferon gamma
CD49b – Marcador de superfície celular de células <i>Natural Killer</i>	Ig – Imunoglobulina
CD5 – Marcador de superfície celular de linfócitos T totais em cães	IgE – Imunoglobulina da classe E
CD8 – Marcador de superfície celular de linfócitos T citotóxicos	IgG – Imunoglobulina da classe G
de BSA	IgG1 – Imunoglobulina da subclasse G1
de BSA e 0,5% de saponina	IgG2a – Imunoglobulina da subclasse G2
DNA – <i>Deoxyribonucleic acid</i>	IgG2b – Imunoglobulina da subclasse G2
e.v. – via endovenosa	IgM – Imunoglobulina da classe M
EDTA – Ácido etilendiminotetraacético sal dissódico	IL – Interleucina
ELISA – <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	iNOS – Enzima óxido nítrico sintase induzível
	LBSap – antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> + saponina
	LC – Leishmaniose cutânea

LDU – <i>Leishman Donovan Unit</i>	LVM – Leishmaniose visceral murina
LIT – <i>Liver Infusion Tryptose</i>	MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
LM – Grupo Leishmune [®]	MHC-II – complexo de histocompatibilidade principal de classe II
LT – Grupo Leish-Tec [®]	
LV – Leishmaniose visceral	
LVC – Leishmaniose visceral canina	
LVH – Leishmaniose visceral humana	
NK – Células <i>Natural Killer</i>	
NO – Óxido Nítrico	
PBS – Tampão Fosfato Salínico	
PBS-W – Tampão Fosfato Salínico com 0,5% de BSA e 0,1% de Azida sódica	
PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	
PE-Cy5 – Ficoeritrina-Cianina 5	
rpm – rotação por minuto	
s.c. – via subcutânea	
Sb5 ⁺ – N-metil glucamina pentavalente	
SSC – <i>Side Scatter</i> (Granulosidade celular)	
T0 – Tempo antes da imunização	
T1 – Tempo 14 dias após a 3 ^o dose de imunização	
T2 – Tempo 30 dias após a infecção	
Th1 – <i>T helper 1</i>	
Th17 – <i>T helper 17</i>	
Th2 – <i>T helper 2</i>	
Th9 – <i>T helper 9</i>	
TLR2 – <i>Toll-like receptor 2</i>	
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alfa	
Treg – Células T reguladoras	
WHO – <i>World Health Organization</i>	

Resumo

É consenso que a estratégia mais racional para o controle da leishmaniose visceral, que tem como agente etiológico a *Leishmania chagasi* (sinonímia *L. infantum*), seria o emprego de uma vacina que proteja o cão impedindo o seu papel de reservatório doméstico do parasito. Assim, considerando o camundongo como modelo experimental amplamente utilizado em ensaios pré-clínicos vacinais anti-*Leishmania*, é de extrema importância analisar, neste modelo, candidatos vacinais de forma pareada e simultânea. Neste sentido, este projeto avaliou um ensaio pré-clínico vacinal, para análise comparativa de aspectos relacionados a imunogenicidade e eficácia dos candidatos vacinais contra leishmaniose visceral, entre os quais: Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e vacina LBSap (composta de antígeno bruto de *L. braziliensis* e saponina). Dessa forma, camundongos BALB/c foram imunizados com três doses de cada vacina e, após trinta dias da última dose vacinal, os animais foram desafiados experimentalmente com promastigotas de *L. chagasi*. Trinta dias após o desafio, os animais foram submetidos a eutanásia. Nos tempos antes da 1^o dose vacinal (T0), 14 dias após a 3^o dose (T1) e antes da eutanásia (T2), amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital para realização do leucograma e avaliação do perfil imunofenotípico, *ex vivo*, de leucócitos circulantes. O baço e o fígado foram coletados no tempo T2 para avaliação da carga parasitária pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados obtidos indicam que todas as vacinas são incócuas e seguras para a administração. Dentre as principais alterações relacionadas ao estabelecimento de mecanismos imunoprotetores destaca-se o aumento dos níveis de células NK CD3⁻CD49b⁺ observado em T2 para os diferentes grupos vacinais (LT, LM, LBSap). Além disto, ao se avaliar a imunidade adaptativa, foi observado no grupo LT aumento de linfócitos T totais CD3⁺ em T2, que pode ser associado ao aumento da subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ no mesmo período. De forma interessante, a imunização com vacina LBSap induziu aumento da população de linfócitos T totais CD3⁺ tanto após o protocolo vacinal (T1) como após o desafio experimental (T2). Este aumento relatado no grupo LBSap parece ser reflexo da expansão da população de linfócitos T CD4⁺ nos mesmos tempos (T1 e T2). Semelhantemente, o grupo LM apresentou este mesmo perfil de reposta imune com aumento de linfócitos T CD4⁺ tanto em T1 como em T2. Este perfil imunofenotípico parece ter favorecido o controle do parasitismo tecidual tanto no baço como no fígado para as diferentes vacinas avaliadas. Neste contexto, foi observada redução da carga parasitária esplênica de 36% (LT), 63% (LM) e 42% (LBSap). Além disto, a análise da carga parasitária hepática revelou redução do parasitismo de 48% (LT), 71% (LM) e 62% (LBSap). Estes resultados parecem indicar o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores pelos diferentes imunobiológicos avaliados, compatível com a redução da carga parasitária no baço e fígado de camundongos imunizados com as vacinas LT, LM e LBSap. Buscando ampliar a identificação de biomarcadores associados a indução de imunoproteção, será realizada como perspectiva a dosagem de imunoglobulinas anti-*Leishmania* (IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b), bem como a análise do perfil de citocinas.

Abstract

The most rational strategy to control visceral leishmaniasis, that presented *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*) as etiological agent, would be the vaccine for protecting the dog and blocking the domestic parasite reservoir status. Thus, considering the experimental mouse model is widely used in anti-*Leishmania* vaccine pre-clinical trials, it is extremely important to analyze, in this model, vaccine candidates in a simultaneous approach. In this sense, a vaccine pre-clinical trial was performed, including analysis of immunogenicity and protection levels, in different groups, as follows: Leish-Tec[®], Leishmune[®] and LBSap (composed by *L. braziliensis* antigens plus saponin). Thus, BALB/c mice were inoculated with three doses of each vaccine and challenged with *L. chagasi*. Thirty days post-challenge all animals were submitted to euthanasia. At the time points before the first dose (T0), after third dose (T1; 14 days after the last dose) and 30 days after *L. chagasi* challenge (T2) the blood was collected in order to evaluate the hemogram and *ex vivo* immunophenotyping in whole blood leukocytes. The spleen and liver were collected at T2 for analyzing parasite load quantified by real time PCR. Results displayed that all vaccines are safe and innocuous to the administration in mice. Among the major changes related to the establishment of immunoprotector mechanisms NK cells (CD3⁻CD49b⁺) presented increased levels at T2 in the different vaccine groups (LT, LM, LBSap). Furthermore, the induction of adaptive immunity was observed in LT group showing higher CD3⁺ T-lymphocytes at T2, which can be associated with CD3⁺CD4⁺ T-subset at same time. Interestingly, LBSap immunizations induced higher CD3⁺ T-lymphocytes in both after vaccine protocol (T1) and experimental challenge (T2). This data would be associated in LBSap group to increased levels in the CD3⁺CD4⁺ T-subsets at the same time (T1 and T2). Similarly, LM group presented the same immune profile, displaying increased levels in CD3⁺CD4⁺ T-lymphocytes in both T1 and T2. This immunophenotypic profile seems to act in the spleen and liver parasitism control considering the different evaluated vaccines. In this context, the reduction in the spleen parasite load was 36% (LT), 63% (LM) and 42% (LBSap). Moreover, analysis in the liver parasite load demonstrated reduction of 48% (LT), 71% (LM) and 62% (LBSap). These results suggest the establishment of immunoprotection mechanisms in the different evaluated vaccines as related by control in the spleen and liver parasite burden considering LT, LM and LBSap immunized mice. Aiming to further analyze the additional biomarkers associated with immunoprotection, analyzes of anti-*Leishmania* immunoglobulins (IgG, IgG1, IgG2a and IgG2b) and the cytokine profile will be performed as perspective.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais relacionados à *Leishmania* e as leishmanioses

A leishmaniose é a segunda mais importante protozoose do mundo, está entre as seis endemias de maior relevância e cerca de 350 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença em 88 países do mundo, sendo 72 destes países em desenvolvimento. Atualmente, mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas e a cada ano ocorrem aproximadamente 2 milhões de novos casos em todo mundo (Desjeux, 2004; WHO, 2012).

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 65 países, com incidência anual de 500.000 casos, sendo que 90% dos mesmos estão concentrados na Índia, Nepal, Bangladesh e Brasil, país que concentra cerca de 90% dos casos do continente Americano (Desjeux, 2004). No Brasil, a forma visceral está presente em 21 estados (Harhay *et al.*, 2011) e desde a década de 70 vem se observando a urbanização da doença e o aumento de sua incidência bem como o número de óbitos. Em 2011, foram confirmados 3.894 casos de LV no país e 262 pessoas vieram a óbito devido a esta doença (Sinan/SVS/MS). Sendo assim, fica claro o caráter emergente/re-emergente desta doença no Brasil e no mundo.

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, descritos em 1903 por Ross. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde divide as leishmanioses em quatro formas clínicas distintas: forma cutânea, forma mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. Admitem-se que há três espécies de *Leishmania* que causam a LV incluídas no subgênero *Leishmania* por Lainson & Shaw (1987). Estas espécies encontram-se agrupadas no complexo “*Donovani*”. Entre as espécies que fazem parte deste complexo está a *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903), *Leishmania (L.) infantum* (Nicolle, 1908) ambas do Velho Mundo e *Leishmania (L.) chagasi* do Novo Mundo. No continente americano *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha *et al.*, 1937) é o agente causador da leishmaniose visceral humana (LVH) e canina (LVC). Embora tenham nomes e origens geográficas diferentes, dados moleculares sugerem que *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* sejam a mesma espécie (Maurício *et al.*, 2000).

As espécies causadoras da forma visceral são transmitidas por insetos do gênero *Phlebotomus* no velho mundo (África, Ásia e Europa) e pelo gênero *Lutzomia* no novo mundo (Américas). As fêmeas destes insetos fazem o repasto sanguíneo nos

hospedeiros vertebrados e, dessa forma, injetam formas promastigotas metacíclicas em sua pele (Sacks, 1989). Estas formas promastigotas são fagocitadas por células residentes ou por células que são recrutadas para o local da infecção. Entretanto, somente nos macrófagos os parasitos conseguem sobreviver, diferenciando-se de promastigotas para amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo. As formas amastigotas sofrem sucessivas divisões binárias simples longitudinal até ocorrer a ruptura do macrófago, quando estas formas são liberadas para o sangue ou fluido intersticial, podendo ser ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do hospedeiro invertebrado, as formas amastigotas são diferenciadas em formas promastigotas e através da metaciclogênese se transformam em promastigotas metacíclicas que ao serem injetadas no hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo, concluem um novo ciclo (Sacks, 1989; Kaye *et al.*, 2011). As espécies da forma visceral se propagam sistemicamente em macrófagos de órgãos internos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea, causando uma série de alterações sistêmicas e locais (Kumar & Nylén, 2012).

No homem a LV apresenta uma ampla diversidade clínica, podendo apresentar desde formas assintomáticas até formas sintomáticas com sinais sistêmicos como febre, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso e hipergamaglobulinemia (Ashford, 2000). A redução no número de plaquetas pode causar hemorragias que pode favorecer a ocorrência de septicemia, além da queda do número de leucócitos que pode causar uma imunossupressão, propiciando infecções oportunistas. Caso a doença não seja devidamente tratada o paciente pode ir a óbito (Kaye & Scott, 2011; Kumar & Nylén, 2012).

O diagnóstico da doença é complexo porque outras doenças como a malária, febre tifoide, tuberculose, dentre outras, podem compartilhar suas características clínicas e estar presentes juntamente com a LVH, havendo uma co-infecção. Além disto, a localização do parasito no baço, fígado, medula óssea e linfonodos dificulta o diagnóstico parasitológico direto (Singh *et al.*, 2006). O padrão ouro para o diagnóstico é a demonstração do parasito (forma amastigota) em biópsia de tecido, porém, este procedimento necessita ser feito por um médico em um ambiente hospitalar e pode oferecer riscos ao paciente por ser um método invasivo (Sundar & Rai, 2002). Testes sorológicos, como a pesquisa de anticorpos anti-rk39, que é uma proteína recombinante

de antígenos específicos de parasitos do complexo “*Donovani*”, juntamente com os sintomas clínicos podem indicar a presença da LVH e é muito utilizado nas áreas endêmicas (Sundar *et al.*, 2002).

As opções de tratamento para a LVH são limitadas e estão longe de serem satisfatórias. Todos os fármacos disponíveis devem ser administrados por via parenteral (exceto a miltefosina) e durante um longo período de tempo (geralmente 20 dias), além de serem potencialmente tóxicos. No Brasil, recomenda-se o tratamento da LVH, com a dose de 20mg/Kg/dia de antimoniato N-metil glucamina pentavalente (Sb^{5+}) por via endovenosa ou intramuscular por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias. O principal efeito colateral do Sb^{5+} é decorrente da sua ação no aparelho cardiovascular e outras reações adversas também são observadas como insuficiência renal aguda, icterícia e pancreatite (Ministério da Saúde, 2006). Em nosso país o tratamento com Sb^{5+} tem alcançado um bom índice de cura e existem poucos relatos de resistência. Entretanto, na Índia vem se observando uma grande resistência dos parasitos aos compostos de antimoniais (Singh *et al.*, 2006). Vale ressaltar que se não houver tratamento, a pessoa infectada e sintomática pode evoluir para o óbito.

Para conter o avanço da doença as medidas de controle são imprescindíveis. O principal objetivo é interromper a cadeia de transmissão do parasito através de um tripé de ações que incluem o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, eliminação do inseto vetor através de inseticidas piretróides de ação residual e eutanásia de cães que apresentam sorologia positiva (Tesh, 1995; Ministério da Saúde, 2006). Porém, estas medidas de controle são caras e não tem contribuído de forma efetiva na redução da incidência da doença.

Neste sentido, vale ressaltar que os cães exercem importante papel na manutenção do parasito, sendo o principal reservatório doméstico da *L. chagasi* (Deane & Deane, 1962) e que os casos de LVC precedem a ocorrência de casos humanos. Além disso, é importante salientar que a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (Chagas *et al.*, 1938; Deane, 1956; Almeida-Silva, 2002). Atualmente, a medida adotada pelos centros de zoonose quando se constata que o cão está com a sorologia positiva para a *L. chagasi* é o recolhimento deste animal e a sua eutanásia. Diferentes estudos demonstram que esta medida pode reduzir a incidência da LV em cães e em humanos (Magalhães *et al.*, 1980; Ashford *et al.*, 1993). Entretanto, o que se observa

anualmente é o aumento da incidência da doença. Alguns autores atribuem este aumento a fatores como a baixa sensibilidade dos testes sorológicos, que podem não detectar cães com baixos níveis de imunoglobulinas anti-*L. chagasi*, mantendo assim o reservatório do parasito nas áreas endêmicas. Outra possibilidade é o potencial de coexistência de diferentes tipos epidemiológicos da LVH no Brasil com a existência de outros reservatórios (Biagi, 1953; Ashford *et al.*, 1993; Machado Braga *et al.*, 1998).

Outro fator importante associado a dificuldade de eliminação do reservatório do parasito é o impacto social e emocional que a prática da eutanásia de cães soropositivos causa em seus donos, que muitas vezes os consideram como parte da família (Dantas-Torres, 2006). É comum em áreas endêmicas como em Belo Horizonte-MG, a prática terapêutica da LVC como rotina nas clínicas veterinárias. Estes tratamentos, quando realizados com produtos de uso humano, são proibidos pelo Ministério da Saúde de acordo com a portaria interministerial do Ministério da Saúde (nº1.426, de 11 de julho de 2008), pois colocam em risco os programas de controle da LV, expondo a população humana e canina ao risco de infecção. Até o momento não existe no mercado esquema terapêutico que seja capaz de promover a cura parasitológica em cães. Assim, diferentes estudos demonstram que estes animais podem até apresentar melhora clínica, mas o parasitismo na pele persiste e este cão continua sendo fonte de transmissão do parasito para o flebotomíneo. Além disso, é importante mencionar que este tratamento pode também selecionar cepas resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento humano (Neogy *et al.*, 1994; Noli & Auxilia, 2005; Saridomichelakis *et al.*, 2005; Pasa *et al.*, 2005; Vouldoukis *et al.*, 2006; Ministério da Saúde, 2006).

Desta forma, a melhor alternativa para combater a crescente expansão da doença seria uma vacina anti-LVC, que pode contribuir de forma efetiva nos programas de controle do Ministério da Saúde. Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm buscado respostas para a prevenção da LVC, porém, até o momento ainda não há uma vacina comprovadamente eficaz para ser recomendada pelo Ministério da Saúde/Brasil nas campanhas de controle nacional (Gradoni, 2001; Mael, 2002; Ministério da Saúde, 2006; Costa *et al.*, 2011).

2. Revisão de Literatura

2.1 Fatores imunológicos relacionados a leishmaniose visceral murina

A defesa contra microorganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade natural e as respostas tardias da imunidade adquirida. A imunidade inata ou natural é a linha de defesa inicial contra os microorganismos, consistindo em mecanismos de defesa celular e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para agir rapidamente a infecções e aos produtos de células lesadas. Os principais componentes da resposta imune inata são barreiras físicas e químicas, células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), células *Natural Killer* (NK), proteínas do sistema complemento, citocinas, dentre outros.

Já a imunidade adaptativa ou adquirida é estimulada pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumenta a cada exposição. Dessa forma, a resposta imune adaptativa é considerada específica, pois possui memória imunológica e especificidade. Os principais componentes desta resposta são os linfócitos T que fazem parte da imunidade celular e os linfócitos B que atuam pela imunidade humoral (Batista & Harwood, 2009; Zhu & Paul, 2010; Kumar *et al.*, 2011).

A resposta imune anti-*Leishmania* envolve mecanismos tanto da resposta imune inata quanto da adquirida. Na década de 1980, foram identificados dois tipos de respostas imunes distintas em camundongos infectados por *L. major*: as linhagens de camundongos que apresentavam uma resistência a infecção exibiam um perfil com a presença de células T CD4⁺ protetoras, denominadas *T helper 1* (Th1) com produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ) e interleucina (IL)-12, porém outras linhagens se mostravam susceptíveis a infecção e estas apresentavam um predomínio de células T CD4⁺, denominadas *T helper 2* (Th2), com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Desde então formou-se o paradigma de que a resposta Th1 está associada a resistência a infecções intracelulares e a resposta Th2 a susceptibilidade (Mosmann *et al.*, 1986; Heinzel *et al.*, 1989). Entretanto, atualmente sabe-se que existem diferentes tipos celulares que podem estar envolvidos no processo de resistência/susceptibilidade, como as células NK, diversas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th17, Treg, Th9) e linfócitos T CD8⁺ (Alexander & Brombacher, 2012).

Já foi estabelecido que a resposta imune protetora contra a leishmaniose cutânea causada por *L. major*, *L. mexicana* ou *L. amazonensis*, assim como a leishmaniose

visceral causada por *L. donovani* ou *L. chagasi*, é dependente do desenvolvimento de uma resposta do tipo 1 (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Diferentes estudos mostraram que a IL-12, produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e células dendríticas, induzem a diferenciação e produção de células Th1, com produção de IFN- γ . Esta citocina intercede a ativação de macrófagos e a produção de óxido nítrico causando a morte do parasito no interior desta célula (Cunningham, 2002; Barbi *et al.*, 2009). Por outro lado, já foi descrito também que a IL-4, produzida principalmente por linfócitos T, possui ação moduladora em modelo murino, regulando a secreção ou inibindo os efeitos protetores das citocinas do tipo I como IFN- γ e IL-12, desta forma, níveis altos desta citocina estão correlacionados a susceptibilidade ao parasito (Miralles *et al.*, 1994). Entretanto, foi observado em camundongos vacinados com o antígeno A2 e infectados por *L. donovani*, um perfil misto de resposta imunológica, com produção das citocinas IFN- γ e IL-4 e redução da carga parasitária. Desta forma, acredita-se que um perfil misto de citocinas poderia induzir a redução da carga parasitária e reduzir os danos teciduais causados por uma resposta do tipo I exarcebada (Ghosh *et al.*, 2002).

Estudos utilizando camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* mostraram que nas primeiras 2-4 semanas de infecção não houve ativação de células T nos esplenócitos destes camundongos. Neste mesmo estudo, foi observado que após quatro semanas de infecção, houve produção de IL-2 e de IFN- γ o que coincidiu com a redução de 80% do parasitismo intra-hepático. Ainda neste trabalho, foi utilizado uma linhagem de camundongos BALB/c deficiente de células T, que não conseguiram controlar o parasitismo intra-hepático, mesmo após tratamento com IL-12 recombinante. No entanto, estes autores mostraram que após o tratamento com IFN- γ recombinante a replicação do parasito no fígado, destes animais, foi totalmente interrompida devido a ativação dos macrófagos, destacando, assim, o efeito leishmanicida desta citocina (Murray *et al.*, 1987).

Do ponto de vista da resposta imune humoral na leishmaniose visceral murina (LVM), diferentes estudos mostram que a presença de linfócitos B e de anticorpos contribuem para a morbidade da doença, através da produção de IL-10 e de imunoglobulinas das classes IgG e IgM (Deak *et al.*, 2010; Ronet *et al.*, 2010). Alguns

autores procuram associar a presença de determinado subtipos de IgG aos perfis de resposta de citocinas do tipo I ou II, visando determinar marcadores sorológicos de proteção ou progressão da doença. Assim, Alexander e Brombacher (2012) sugerem que a resposta do tipo I está correlacionada com a produção de IgG2a e IgG2b e que a presença de IgE e IgG1 está ligada a uma resposta tipo 2.

Apesar de vários estudos mostrarem a influência dos fatores imunológicos na determinação da resistência ou susceptibilidade a infecção, é importante salientar a influência também dos fatores genéticos nesta situação. A LV é uma doença complexa, por isso, espera-se que múltiplos genes influenciam a susceptibilidade a doença (Blackwell *et al.*, 2009). Um estudo conduzido por Kaye *et al.* (2004) mostrou que camundongos BALB/c possuem suscetibilidade nas fases iniciais da infecção causada por *Leishmania* spp.. Esta linhagem possui o gene de resistência inata *Slc11a1* não funcional, que codifica uma proteína que é expressa na membrana dos fagossomas em macrófagos e remove os íons de Fe^{2+} e Mn^{2+} do compartimento intra-fagossomal. Dessa forma, os parasitos que necessitam destes íons para sobreviver não conseguem mais se multiplicar e morrem (Kaye *et al.*, 2004). Entretanto, nas fases mais tardias da doença estes camundongos conseguem controlar o parasitismo hepático através da resposta imune adquirida (Lipoldova & Demant, 2006; Stanley & Engwerda, 2007).

2.2 Modelos experimentais para vacinas anti-LV

A escolha do modelo e do desenho experimental são fundamentais para o sucesso dos estudos em vacinologia anti-*Leishmania*. Neste sentido, diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados em ensaios vacinais para o desenvolvimento de imunoprolifáticos anti-LV (Garg & Dube, 2006; Reis *et al.*, 2010).

O modelo murino vem sendo amplamente utilizado já que tem fácil manejo, baixo custo, tempo de experimentação curto e grande disponibilidade de reagentes imunobiológicos (Garg & Dube, 2006). Neste contexto, este modelo pode ser útil na triagem de candidatos vacinas, já que a utilização do cão como modelo para ensaios clínicos apresenta dificuldades devido ao elevado custo de manutenção, a pouca disponibilidade de reagentes e ao longo período de experimentação, que frequentemente ultrapassa dois anos de acompanhamento.

Outro modelo disponível é o hamster, mas devido a pouca disponibilidade de reagentes imunobiológicos no mercado, este modelo não é muito utilizado em estudos imunológicos.

Diferentes trabalhos utilizam camundongos de diversas linhagens. Dentre elas as mais utilizadas são o camundongo Suiço albino (*Swiss*) que é considerado *outbred*, pois resultam de acasalamentos ao acaso e possuem grande variabilidade genética. As linhagens BALB/c e C57BL/6, que pertencem à classe de camundongos isogênicos (*inbred*), são resultantes de acasalamentos entre irmãos, o que confere uma uniformidade genética (Andrade *et al.*, 2002). Entretanto, para o estudo de vacinas anti-LV a linhagem mais utilizada é o BALB/c, pois ela possui um perfil de citocinas do tipo II e desta forma é susceptível a infecção, diferente do C57BL/6 que possui padrão de citocinas tipo I, sendo pouco susceptível a infecção na LV.

Além disto, tem sido descrito que o perfil da infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c inoculados por via intravenosa é capaz de induzir hepatoesplenomegalia, resultante da alta carga parasitária nestes órgãos, com a manutenção de elevada carga parasitária esplênica por semanas (Leclercq *et al.*, 1996; Smelt *et al.*, 1997). O controle da forma visceral neste modelo é dependente da citocina IL-12 e da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ (Kirkpatrick & Farrell 1982; Murray, 1997; Murray *et al.*, 2005). Deste modo, fica claro que o estabelecimento de mecanismos efetores da imunidade adaptativa anti-*Leishmania*, que é o alvo dos estudos vacinais contra este agente, é determinante para o controle do parasito. Isto torna o modelo murino altamente atrativo para estudos vacinais contra a LV. Assim, o curso da infecção por *L. chagasi* e/ou *L. infantum* neste modelo experimental favorece a realização de ensaios pré-clínicos vacinais, na tentativa de se realizar uma triagem otimizada de imunobiológicos candidatos a vacina contra LV.

É importante destacar que um dos problemas encontrados em estudos utilizando a infecção por *Leishmania* em camundongos é a dificuldade de visceralização do parasito. De modo geral, diferentes trabalhos utilizam altas doses do parasito (100 a 1000 vezes maior do que a infecção natural) por via endovenosa (e.v.) ou intraperitoneal (i.p.), já que a infecção natural ou por inoculação subcutânea/intradérmica podem não produzir uma infecção progressiva (Melby *et al.*, 1998; Rolão *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2011). Em camundongos BALB/c a infecção no fígado é auto-resolutiva e em aproximadamente

quatro semanas, observa-se redução da carga parasitária neste órgão. Concomitantemente, ocorre um pico de parasitismo no baço que vai diminuindo até se tornar estável e crônica. Assim, nesta linhagem a LV é geralmente assintomática (Miralles *et al.*, 1994; Engwerda *et al.*, 2004).

2.3 Adjuvantes em vacinas anti-leishmaniose visceral em modelos experimentais

Alguns antígenos vacinais, especificamente as vacinas não-vivas compostas de subunidades purificadas e/ou recombinantes, são muitas vezes fracas no quesito de imunogenicidade e requerem componentes adicionais para ajudar a estimular a imunidade protetora com base na produção de anticorpos ou células T efectoras. Assim, esses componentes adicionais, denominados adjuvantes (do latim – *adjuvare* - que significa ajudar) são necessários para aumentar a imunogenicidade destes antígenos.

Os adjuvantes são usados tradicionalmente para aumentar a magnitude da resposta imune frente a uma vacina e tem se tornado cada vez mais importante para guiar o tipo de resposta adaptativa e induzir as formas mais eficazes de imunidade a cada patógeno (Coffman *et al.*, 2010). O adjuvante ideal pode reduzir o número de doses vacinais e a quantidade de antígeno utilizado na formulação vacinal, reduzindo assim os custos, além de prolongar e intensificar a resposta imunológica.

Os adjuvantes são um grupo muito heterogêneo de compostos e são classificados de acordo com o seu modo de ação, eles podem agir como veículos de entrega que liberam o antígeno lentamente, visando o maior tempo de fagocitose ou de contato com as células imunocompetentes. Como imunoestimulantes que aumentam e induzem um determinado tipo de resposta imunológica ou ainda agonistas de *Toll like* receptores. Os adjuvantes podem pertencer a mais de uma classe e vários autores propõem diferentes classificações.

Atualmente, somente dois adjuvantes estão disponíveis para uso em humanos, o hidróxido de alumínio (Alumen) e o fosfato de alumínio. Entretanto, para uso animal e experimental existem diversos tipos, tais como o hidróxido de alumínio, emulsões (água/óleo, água/óleo/água, óleo mineral e óleo vegetal), lipossomas, nanopartículas e micropartículas, proteínas carreadoras, saponina e suas frações, entre outros (Spickler & Roth, 2003; Baumgartner & Malherbe, 2010; Coffman *et al.*, 2010).

Neste sentido, um adjuvante ideal para ser utilizado juntamente com antígenos anti-*Leishmania* seria aquele que induzisse uma resposta com ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com um perfil de citocinas predominantemente do tipo I. Neste contexto, o adjuvante saponina é licenciado para uso veterinário e possui estas características, sendo um adjuvante que modula seletivamente a resposta imune. A saponina é purificada a partir de extratos da casca de uma árvore da América Latina, denominada *Quillaja saponaria* e possui em sua composição glicosídeos triterpenóides. Este adjuvante aumenta a absorção do antígeno pelas células dendríticas e estas células migram para órgãos linfóides secundários onde é feita a apresentação destes antígenos aos linfócitos T CD4⁺ *naives* através do complexo principal de histocompatibilidade II (MHCII) (Coffman *et al.*, 2012). Vitoriano-Souza *et al.* (2012) relataram, em seu estudo, que a saponina é capaz de aumentar o infiltrado celular local além de aumentar os níveis de IL-2, IL-6 e de IL-4. Apesar dos relatos de que este adjuvante causa hemólise, neste estudo não foi observado nenhum tipo de alteração no local do inóculo, assim como nos parâmetros hematológicos.

Já foi relatado também que a saponina possui um radical acil que parece ser responsável por uma intensa indução de resposta do tipo I (citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ e produção de IgG2a), bem como indução de resposta Th2 (Liu *et al.*, 2002).

2.4 Estratégias imunoproláticas anti-leishmaniose visceral em modelos experimentais

A vacinologia é o ramo da biologia que foca no desenvolvimento de uma vacina funcional que proteja o hospedeiro contra um microorganismo em particular. Esta proteção se dá pelo desenvolvimento de uma resposta imune humoral e/ou celular ativa bem como pela formação de células de memória. As vacinas são uma das maiores descobertas da medicina moderna e muitas tiveram ou tem ações efetivas, como no caso da varíola, poliomielite, tifo, tétano e das hepatites A e B, dentre outras. Entretanto, inúmeras doenças ainda não possuem uma vacina segura e eficaz, seja pela complexidade do agente etiológico, capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro ou pela rapidez que o mesmo sofre mutação, dentre outros fatores. Entre

essas doenças podemos citar a Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida (AIDS), malária, doença de Chagas, hepatite C e as leishmanioses (Weiner & Kennedy, 1999).

Uma vacina anti-leishmaniose ideal teria que ter vários atributos, mas nem todos podem ser facilmente alcançados. Estes incluem: (i) segurança, (ii) preço acessível as populações carentes, (iii) indução de memória imunológica de longo prazo, minimizando o número e a dose de imunização, (iv) eficácia contra a LV e LC, (v) estabilidade (Coler & Reed, 2005; Kedzierski *et al.*, 2006).

Embora uma vacina segura e eficaz ainda não tenha sido desenvolvida para atuar em programas de controle oficiais da LV, muito esforço tem sido despendido nesta área e vários candidatos vacinais têm sido extensivamente estudados (Lemesre *et al.*, 2007; Roatt *et al.*, 2012; Singh & Sundar, 2012).

Estudos de desenvolvimento de vacinas devem acompanhar um organograma de fases de pesquisa que vão desde a Fase I, que visa a pesquisa de dosagem, toxicidade, efeitos colaterais e imunogenicidade da vacina, até a Fase IV, que foca a vigilância após a comercialização do produto. Esse processo passa pela Fase II, que visa demonstrar a eficácia (no caso de vacina, a proteção), a segurança e a aceitabilidade do produto e pela Fase III, que visa determinar a eficácia do produto em indicações específicas e precisar seus efeitos colaterais através da comparação do novo produto com o produto tradicional ou com placebo (Pereira, 1995).

Os imunobiológicos empregados em intervenções vacinais contra leishmaniose podem ser agrupados em três classes, no que se refere ao seu processo de produção, sendo elas: vacinas de 1º geração que são compostas de antígenos brutos que geralmente encontram-se vivos/atenuados ou fixados, vacinas de 2º geração que são constituídas por subunidades definidas, denominadas antígenos recombinantes. Vale ressaltar que as vacinas de segunda geração incluem bactérias ou vírus recombinantes, além de utilização de vacinas vivas como, por exemplo, o uso de *Leishmania* geneticamente modificada (Santos *et al.*, 2002). Com o avanço dos estudos genômicos e pós-genômicos surgiram as vacinas de 3º geração (vacinas de DNA), constituídas de genes que codificam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos (Palatnik-de-Souza, 2008).

Apesar do grande esforço despendido para a produção de vacinas de 2º geração, em função de serem subunidades definidas que apresentariam maior facilidade de

padronização do produto final, os resultados ainda pouco expressivos estimulam o estudo de vacinas compostas por antígenos brutos. Isso ocorre pelo fato destes antígenos apresentarem grandes chances no desenvolvimento de vacinas contra protozoários já que contemplam múltiplas subunidades antigênicas com capacidade de ativar um maior repertório de linfócitos T. Além disso, as vacinas de 1^a geração apresentam maior estabilidade e segurança com relação as vacinas de DNA e as de subunidades purificadas, tornando o seu custo mais acessível aos países em desenvolvimento (Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b).

Um imunobiológico anti-LVC de 1^a geração que vem sendo bastante estudado, foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em parceria com o Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). Esta vacina foi denominada LBSap e possui em sua composição antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina. Esta vacina foi patenteada pela UFOP em parceria com pesquisadores do Instituto René Rachou - FIOCRUZ/MG estando inscrito no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com a identificação PI 0601225-6.

A ideia de se utilizar uma vacina composta de antígenos brutos de uma cepa dermatotrópica como a *L. braziliensis*, surgiu com a observação do Prof. Odair Genaro (*in memoriam*) de que células de cães com LV quando estimuladas *in vitro* com antígeno de *L. chagasi* apresentavam atividade linfoproliferativa inibida. Por outro lado, quando se utilizava antígeno de *Leishmania* proveniente de cepas dermatotrópicas, a atividade linfoproliferativa de células de cães com LV aumentava significativamente (Genaro, dados não publicados).

Considerando estas observações, foi realizado um ensaio pré-clínico I e II em cães. Neste sentido, a composição vacinal compreendia promastigotas de *L. braziliensis* (MCAN/BR/72/C348), na concentração de proteína total de 600 µg/dose. Para esta composição vacinal foi escolhido como adjuvante o BCG, na concentração de 400 µg/dose. A aplicação foi realizada pela via intra-dérmica, em três doses, com intervalo de 21. Após 26 meses de acompanhamento foi observado 90% de proteção no grupo vacinado e 100% de infecção no grupo controle. Entre os cães vacinados, 90% apresentaram índice de resposta linfoproliferativa positiva enquanto o grupo controle permaneceu não responsivo. Além disto, o grupo vacinado não produziu anticorpos

anti-*Leishmania*, diferentemente do grupo controle, em que alguns animais apresentaram reação sorológica positiva a partir de 3 meses do desafio. Estes resultados indicaram que esta vacina se apresentava segura pelas avaliações de inocuidade e toxicidade e quando combinada com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), apresentou indução na resposta imune celular, conferindo proteção a 90% aos cães desafiados com *L. chagasi* (Mayrink *et al.*, 1996). Entretanto, após a realização de um ensaio clínico vacinal duplo-cego randomizado (Fase III) na cidade de Montes Claros-MG, foi observado que os resultados do teste de eficácia de vacinação não demonstraram o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *L. chagasi* na população vacinada em relação ao grupo controle (Genaro *et al.*, 1996).

Diante dos resultados obtidos com esta vacina de antígeno bruto e com o estabelecimento de novas metodologias desenvolvidas pelo Laboratório de Imunopatologia, que possibilitaram uma avaliação mais acurada do sistema imune canino e conseqüentemente da história natural da LVC (Giunchetti, 2004; Giunchetti *et al.*, 2006; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006a; Reis *et al.*, 2006b; Reis *et al.*, 2006c), foi proposta a realização de novos estudos vacinais que pudessem incorporar estratégias de análise da resposta imune de forma mais detalhada.

Desta forma, foi testado pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Imunopatologia (LIMP) uma nova vacina composta por antígenos brutos de *L. braziliensis* associada a um potente adjuvante indutor da resposta imune celular (saponina), esta vacina foi denominada LBSap. Diversos trabalhos demonstraram que hamsters e cães vacinados com a LBSap apresentam um forte infiltrado inflamatório no local do inóculo com intensa expressão de iNOS, sem evoluir para lesões ulceradas. Além disso, é importante salientar que este imunobiológico é inócuo e seguro para administração (Giunchetti, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009). Esta vacina foi capaz de induzir, em cães, o aumento dos níveis de IgG total, IgG1, IgG2 anti-*Leishmania* assim como dos níveis de linfócitos T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺), B (CD21⁺) circulantes e linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos (Giunchetti, 2007; Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008b).

Outros trabalhos desenvolvidos pelo LIMP demonstraram que após o desafio experimental por *L. chagasi*, os cães apresentaram uma manutenção do perfil de ativação linfocitária relacionada ao fenótipo de resistência (aumento de linfócitos T

CD5⁺ e CD8⁺ bem como monócitos CD14⁺) com intensa atividade linfoproliferativa *Leishmania*-específica. Além disso, foi observado aumento da expressão de IFN- γ e redução de IL-10 e TGF- β 1 em esplenócitos estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania*, refletindo em um baixo parasitismo na medula óssea e redução de 54% de parasitos no baço (Roatt, 2010; Motta, 2011; Mendonça, 2011; Resende, 2011; Roatt *et al.*, 2012). Devido a estes resultados, a LBSap tem sido considerada um promissor antígeno vacinal contra a LVC.

Até o presente momento, ainda não há estudos comparando-se a vacina LBSap com outros imunobiológicos, tais como aqueles disponíveis comercialmente.

Dessa forma, torna-se extremamente relevante, estudos que possam ser incorporados na mesma plataforma de análise, dentro do mesmo ensaio pré-clínico vacinal, para análise do desempenho de candidatos vacinais em relação aos imunobiológicos comercialmente disponíveis em nosso país. Esta estratégia pretende contribuir para a análise comparativa do desempenho de candidatos vacinais, considerando aspectos relacionados a imunogenicidade e eficácia vacinal.

Entre as vacinas de 2^o geração destacam-se três vacinas anti-LVC, duas delas comercialmente disponíveis no Brasil e aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo estas: Leishmune[®] e Leish-Tec[®] e outra a CaniLeish[®] comercialmente disponível na Europa e licenciada pela Agência Nacional de Medicamentos.

A CaniLeish[®] (Virbac, França), foi desenvolvida pela equipe do Dr. Papierok na França e recentemente lançada na Europa. Esta vacina possui em sua composição antígenos excretados/secretados, encontrados naturalmente no sobrenadante da cultura de promastigotas de *L. infantum* (100 μ g/dose), cujos antígenos são purificados e utilizados juntamente com uma fração purificada da saponina (QA-21, 60 μ g/dose) sendo esta formulação vacinal denominada tecnicamente por LiESP/QA-21. Em estudos utilizando cães, esta vacina foi capaz de induzir um perfil Th1 e reduzir a carga parasitária, *in vitro*, de macrófagos infectados co-cultivados com linfócitos de cães imunizados (Moreno *et al.*, 2012). Esta vacina será lançada em Portugal e em seguida em outros países da Europa onde há endemicidade da LVC, como Espanha, França, Grécia e Itália.

A Leishmune[®] é composta pelo complexo de glicoproteínas denominado de ligante de fucose-manose (FML) e a saponina *Riedel de Haen* como adjuvante. O FML está presente na superfície das formas amastigotas e promastigotas e é uma mistura de glicoproteínas, sendo o glicoconjugado gp36 o componente imunogênico principal. Já foi demonstrado que este complexo reduz, *in vitro*, a internalização dos parasitos pelos macrófagos (Palatnik-de-Souza *et al.*, 1993). Estudos utilizando o antígeno FML mais a saponina, mostraram que após três doses desta formulação vacinal os camundongos Swiss, desafiados pela via intracardíaca (i.c.) por *L. donovani*, apresentaram redução de 85% a 89% de parasitos no fígado, dependendo da via de inoculação da vacina (intraperitoneal - i.p. ou s.c., respectivamente) (Santos *et al.*, 1999). Outro estudo também utilizando camundongo Swiss imunizados com o antígeno FML mais a saponina e desafiados pela via endovenosa por *L. donovani*, demonstrou uma redução de parasitos no fígado de 73%, sendo atribuído a este resultado os altos níveis de IFN- γ e de IgG1, IgG2a e IgG2b anti-FML (Santos *et al.*, 2002).

Em cães da cidade de São Gonçalo do Amarante, RN (área endêmica para LVC) a Leishmune[®] induziu uma proteção de 80% em ensaios de fase clínica III (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) e em outro estudo, também de área endêmica, foi visto que os cães vacinados com a Leishmune[®] apresentaram ausência de sintomas e de DNA do parasito na pele, sangue e linfonodo (Nogueira *et al.*, 2005).

A Leish-Tec[®], outra vacina comercialmente disponível para uso em cães, contém em sua formulação a proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina. O gene A2 de *L. donovani* codifica uma proteína amastigota-específica que é denominada A2, abundante em amastigotas de *L. donovani* e com peso molecular de 42 a 100kDa. Esta proteína está relacionada a fatores de virulência do parasito que são essenciais para a sobrevivência do protozoário no hospedeiro vertebrado. Já foi visto que amastigotas deficientes de A2 perderam a virulência em camundongos BALB/c e que a mesma foi restaurada quando A2 foi ativada novamente (Charest & Matlashewski, 1994; Zhang & Matlashewski, 1997; Resende *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2002). Antígenos provenientes de formas amastigotas são menos testados do que os de promastigotas, devido a facilidade de se cultivar, *in vitro*, as formas promastigotas e também porque durante muitos anos, amastigotas axênicas não podiam ser cultivadas, pois a única forma de se conseguir estas formas era através de cultura de tecidos de hospedeiros vertebrados.

Entretanto, atualmente é possível obter culturas contendo somente as formas amastigotas. Assim, antígenos de amastigotas que induzem uma resposta imune contra estas formas são extremamente relevantes já que poucas horas após a infecção e durante a infecção ativa somente esta fase está presente nos tecidos do hospedeiro vertebrado (Fernandes *et al.*, 2012).

Estudos utilizando camundongos BALB/c fêmeas imunizadas pela via intraperitoneal com a proteína recombinante A2 administrada juntamente com o adjuvante *Propionibacterium acnes* e infectadas por *L. donovani*, mostraram uma redução de parasitos no fígado de 89%. Além disso, foi observado forte resposta humoral com a presença de anticorpos anti-A2 de várias classes e que os esplenócitos dos camundongos vacinados e estimulados com A2 foram capazes de produzir mais IFN- γ do que o grupo controle, imunizado com PBS e estimulado com A2. Foi observado também que tanto o grupo controle como o grupo vacinado produziram altos níveis de IL-4. Desta forma, a proteção destes camundongos parece estar relacionada a uma resposta Th1/Th2 com a presença de citocinas anti e pró-inflamatórias (Ghosh *et al.*, 2002). Em outro estudo utilizando camundongos BALB/c fêmeas imunizadas intramuscularmente com A2/DNA e experimentalmente infectados por *L. chagasi*, foi observado aumento de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10 no sobrenadante da cultura de esplenócitos. Além disso, a avaliação da carga parasitária do baço e do fígado, pela técnica de diluição limitante, mostrou redução significativa com relação aos grupos controles (Zanin *et al.*, 2007).

Em um estudo utilizando cães da raça *beagle*, foi observado aumento dos níveis IFN- γ e redução de IL-4 nos animais vacinados com três doses da proteína recombinante A2 (100 μ g) mais a saponina (250 μ g). Estes animais foram desafiados experimentalmente por *L. chagasi*, e dos sete cães imunizados e desafiados, cinco apresentaram resultado de PCR positiva. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que todos os animais que não foram imunizados apresentaram PCR positiva para *L. chagasi* (Fernandes *et al.*, 2008).

Até o momento não há na literatura estudos utilizando as vacinas comercialmente disponíveis (Leishmune[®] e Leish-Tec[®]) de forma pareada em camundongos e nem em

cães. Assim, este estudo é de extrema importância para que se observe simultaneamente o perfil de imunogenicidade e de proteção destes imunobiológicos.

3. Justificativa

A leishmaniose visceral é endêmica em muitas regiões do Brasil. A necessidade da erradicação de cães infectados por *L. chagasi* é dada pelo fato destes animais serem os reservatórios domésticos do parasito, ameaçando, dessa forma, a população humana. A eutanásia de animais domésticos é sempre traumática, mas necessária considerando a ineficácia terapêutica, e, neste sentido, tem sido um problema para as autoridades sanitárias. Maior gravidade encontra-se na possibilidade de cães, ainda assintomáticos, servirem como reservatório do parasito, arriscando a saúde de pessoas ao seu redor. Nestas situações, a imunoprofilaxia aparece como uma das únicas alternativas para o controle do parasito, tanto para infecção canina como humana. No entanto, até o momento, ainda não existem vacinas que sejam consideradas eficazes pelo Ministério da Saúde para o controle da LV. Tais fatos nos mostram a importância de estudos que busquem o desenvolvimento de novos antígenos e protocolos vacinais contra LV, que poderão ser utilizados em futuras campanhas de controle. Neste sentido, o modelo murino apresenta características importantes para o estudo de ensaios pré-clínicos vacinais de Fase I e II, como facilidade de manutenção dos animais, rápido período de experimentação e disponibilidade de uma grande diversidade de reagentes imunobiológicos. Além disto, é importante ressaltar que a avaliação de aspectos relacionados a imunogenicidade e eficácia vacinal em camundongos BALB/c imunizados com LBSap, Leishmune[®] e Leish-Tec[®], analisados dentro da mesma plataforma de testes, *in vivo*, pretende elucidar de forma comparativa o desempenho destes imunobiológicos contra *L. chagasi*. Deste modo, estas análises contribuirão subsidiando avaliações do potencial imunoprotetor destas vacinas além de favorecer a implantação em nosso grupo de pesquisa da plataforma de ensaios pré-clínicos para teste de novas formulações vacinais contra LV.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Analisar a imunogenicidade e a eficácia dos imunobiológicos Leish-Tec[®], Leishmune[®] e LBSap em uma plataforma de testes *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos BALB/c vacinados com Leish-Tec[®], Leishmune[®] e com o candidato vacinal LBSap antes e após o protocolo vacinal, bem como após o desafio experimental com *L. chagasi*, os seguintes aspectos:

1. Inocuidade dos imunobiológicos;
2. Parâmetros hematológicos;
3. Perfil imunofenotípico *ex vivo* de leucócitos circulantes;
4. Quantificação da carga parasitária tecidual.

5. Animais, Material e Métodos

5.1 Desenho experimental

Neste projeto utilizaram-se fêmeas de camundongos convencionais da linhagem BALB/c (espécie: *Mus musculos*) com aproximadamente 6-8 semanas de vida, provenientes do Biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz – MG. Estes animais, com idade a partir de 3 semanas (após o desmame), foram mantidos em racks ventiladas lotadas no biotério de experimentação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos experimentais de 5 animais (2 repetições), entre os quais: (i) grupo Controle, (ii) grupo Leish-Tec[®], (iii) grupo Leishmune[®] e (iv) grupo LBSap. Três doses das respectivas vacinas foram administradas (100µL/camundongo/dose) utilizando agulha hipodérmica curta (30G ½) por via subcutânea. O intervalo entre as doses foi de 14 dias. Trinta dias após a última dose foi realizado o desafio experimental com 10⁷ promastigotas de *L. chagasi* (cepa C46), mantidas no Laboratório de Pesquisas Clínicas/CIPHARMA/UFOP. A eutanásia dos animais foi realizada 30 dias após o desafio. Nos tempos T0 (imediatamente antes da 1ª dose), T1 (14 dias após a terceira dose) e T2 (30 dias após o desafio experimental com *L. chagasi*, e antes da eutanásia) foi feita a coleta do sangue do plexo orbital para realização do hemograma e imunofenotipagem de leucócitos *ex vivo*. Além disso, após a eutanásia dos animais, baço e fígado foram coletados para quantificação da carga parasitária através da *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) (Diagrama 1). É importante ressaltar que este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), através do protocolo nº 2011/13 (Anexo 1).

5.2 Grupos experimentais e imunobiológicos empregados

Para realização deste projeto, foram empregados diferentes grupos experimentais, entre os quais:

- (i) **Grupo Controle (Sigla: C, n=5 animais, com uma repetição)** – os animais receberam três aplicações de solução de salina estéril a 0,85% por via subcutânea, em intervalos de 14 dias;

- (ii) **Grupo imunizado com a vacina Leish-Tec[®] (Sigla: LT, n=5 animais, com uma repetição):** Esta vacina comercial é composta pelo antígeno recombinante A2-HIS (0,1mg), saponina (0,5mg), Timerosal 1:10000 (0,01mL) e salina tamponada q. s. p. (1mL). A Leish-Tec[®] foi licenciada no MAPA sob nº 9.270 em 24/01/2007. Cada dose de vacina para cão foi empregada para imunizar 10 camundongos. Neste trabalho cada camundongo recebeu três aplicações de 100µL de Leish-Tec[®], de modo que continha em cada dose 10µg de rA2 e 50µg do adjuvante saponina, inoculados por via subcutânea, em intervalos de 14 dias. Esta concentração de antígeno foi a mesma utilizada por Ghosh *et al.* (2002).
- (iii) **Grupo imunizado com a vacina Leishmune[®] (Sigla: LM, n=5 animais, com uma repetição):** Esta vacina comercial é composta pelo antígeno semi-purificado *fucose-mannose ligant* (FML) liofilizado (1,5mg) e saponina (0,5mg) que no momento do inóculo foi reconstituída em 1 mL de solução de salina estéril a 0,9%. A Leishmune[®] foi licenciada no MAPA sob nº 8.627 em 11/6/03. Cada dose de vacina para cão serviu para imunizar 10 camundongos. Neste trabalho cada camundongo recebeu três aplicações de 100µL de Leishmune[®], de modo que continha em cada dose 150µg de FML e 50µg do adjuvante saponina, em intervalos de 14 dias. Esta concentração de antígeno também foi utilizada nos trabalhos de Palatnik-de-Souza *et al.* (1994); Santos *et al.* (1999) e Santos *et al.* (2002).
- (iv) **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina (Sigla: LBSap, n=5 animais, com uma repetição):** Cada camundongo recebeu três aplicações de 100µL de LBSap, contendo em cada dose 60µg do antígeno de *L. braziliensis* e 100µg do adjuvante saponina, inoculados por via subcutânea, em intervalos de 14 dias. Esta vacina foi produzida a partir de cultura da cepa de *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) cultivada em meio de cultura ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN) associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT). A cultura foi expandida em meio LIT até a obtenção de massa de promastigotas suficiente para a produção do antígeno vacinal conforme metodologia descrita por Giunchetti *et al.* (2007). Realizou-se a lavagem do sedimento de *L. (V.)*

braziliensis com salina estéril 0,85%, descartando o sobrenadante. Após a lavagem, os tubos com a massa (sedimento) de *L. (V.) braziliensis* foram submetidos ao banho com nitrogênio líquido por 30 segundos e, em seguida, em banho-maria a 37°C até o descongelamento. Repetiu-se o procedimento por 3 vezes. O rompimento das promastigotas foi continuado em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor® - Brason Sonic Power Co. EUA) através de 5 ciclos de 1 minuto a 40 Watts em intervalos de 15 segundos. Novamente, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido, seguido pelo descongelamento em banho-maria a 37°C (repetido 3 vezes). Posteriormente, em ultra-som, foram realizados 5 ciclos de 1 minuto. Finalmente, a verificação do rompimento da *Leishmania* foi confirmada através da confecção de lâmina para examinar a presença de promastigotas íntegras. O antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a -80°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry (1951). O preparo do adjuvante saponina que foi utilizado na composição da LBSap e da solução administrada no grupo Controle foi realizado a partir da saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluída em solução salina estéril 0,85% no momento do inóculo.

5.3 Avaliação da inocuidade dos imunobiológicos

O local do inóculo e o comportamento dos animais foi observado no dia da imunização e nos 3 dias subsequentes. Desta forma, foi realizada uma análise macroscópica do local do inóculo, onde foi observado se havia nódulos, pápulas ou feridas. Com relação ao comportamento, foram avaliados sinais clínicos como: dor, agressividade, pêlo eriçado e apatia. Observou-se também o peso destes animais em diferentes tempos: antes da 1ª dose de imunização, após a 3ª dose de imunização e 30 dias após o desafio.

5.4 Desafio experimental

Para a realização do desafio experimental as promastigotas de *L. chagasi* (cepa C46) foram descongeladas e distribuídas, sob condições estéreis, em *Erlenmeyers* contendo meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Estas culturas foram mantidas a 23°C, expandidas e submetidas a repiques para atingir o crescimento exponencial. Desta

forma, após duas semanas de cultura em meio LIT, os parasitos foram removidos para tubos Falcon de 50mL, e submetidos a centrifugação de 3000rpm, por 10 minutos, a 22°C. Após descartar o sobrenadante o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução de salina estéril a 0,85% e, em seguida, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Posteriormente, as promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, *Germany*) e o volume ajustado para que cada 100µl de salina tivesse aproximadamente 10^7 parasitos. A solução de salina e parasitos foi inoculada com agulha hipodérmica curta na veia lateral da cauda dos camundongos, de modo que o inóculo fosse pela via endovenosa.

5.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos foi feita em diferentes tempos (T0- antes da 1ª dose de antígeno vacinal; T1- 14 dias após a última dose vacinal; T2- 30 dias após o desafio, antes da eutanásia). Para isso, uma alíquota de aproximadamente 100 µL de sangue de 5 animais por grupo foi coletado do plexo orbital e colocados em eppendorf de 1,5mL contendo 20µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, as amostras foram analisadas no leitor hematológico veterinário 2800 Vet (Mindray®, China), onde foi avaliada a série vermelha (hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas). O leitor hematológico veterinário não fornece os valores das subpopulações de leucócitos de camundongos, desta forma, uma alíquota do sangue foi destinada a confecção de esfregaços sanguíneos corados pelo corante panótico rápido (Instant-Prov, Pinhais, PR, Brasil) para análise do percentual das populações de leucócitos (neutrófilos bastonetes e segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos). As lâminas foram avaliadas por microscopia óptica em objetiva de imersão, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

5.6 Imunofenotipagem, *ex vivo*, de leucócitos circulantes, por citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades biofísicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido. Esta caracterização inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – *Forward scatter* – FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinado pela refração e reflexão do raio laser – *Side Scatter* – SSC) e intensidade relativa de fluorescência. Estes parâmetros são detectados em um sistema óptico-eletrônico acoplado, emitindo sinais que podem ser medidos e armazenados, para posterior análise (Cram, 2002).

A análise multiparamétrica de diferentes componentes celulares pode ser realizada empregando-se além da análise morfométrica das células, reações contendo fluorocromos distintos, tais como: isotiocianato de fluoresceína (FITC –fluorescência verde ou tipo 1 – FL1), ficoeritrina (PE – fluorescência amarela ou tipo 2 – FL2), ficoeritrina conjugada a cianina 5 (Pe-Cy5 – fluorescência vermelha ou tipo 3 – FL3) e alofocianina (APC - fluorescência vermelha ou tipo 4 – FL4). Neste contexto, para a imunofenotipagem, *ex vivo*, de leucócitos circulantes foram utilizados anticorpos

monoclonais específicos anti-receptores de células murinas, sendo eles: anti-CD3 (Pe-Cy5), anti-CD4 (FITC) e anti-CD8 (APC) para fenotipagem dos linfócitos T; anti-CD3 (Pe-Cy5) e anti-CD49b (FITC) para fenotipagem das células NK; anti-CD19 (FITC) para fenotipagem dos linfócitos B e anti-CD14 (FITC) para monócitos (Tabela 1).

Tabela 1: Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para imunofenotipagem das populações celulares.

Anticorpo	Marca	Catálogo	Clone/Lote	Fluorescência	Fenótipo Alvo
anti-CD3	e-Bioscience	15003182	145-2c11/E060661630	Pe-Cy5	Linfócitos T totais
anti-CD4	e-Bioscience	11004182	GK1-5/E00078-133	FITC	Linfócitos T auxiliares
anti-CD8	e-Bioscience	17008182	53.6-7/E070561330	APC	Linfócitos T citotóxicos
anti-CD19	e-Bioscience	11019182	MB19-1/E00184-1630	FITC	Linfócitos B
anti-CD49b	e-Bioscience	11049182	HMA2/E00340229	FITC	Células NK
anti-CD14	e-Bioscience	11014182	SA2-8/E00166-204	FITC	Monócitos

5.6.1 Estudo do perfil imunofenotípico *ex vivo* de leucócitos circulantes

Com objetivo de realizar a avaliação da imunofenotipagem *ex vivo* de leucócitos circulantes foi realizada a coleta do sangue do plexo orbital dos camundongos em tubos eppendorf contendo 20µL de EDTA. Foram coletados aproximadamente 300µl de sangue por camundongo. Desta forma a metade deste sangue era destinado a avaliação hematológica e a outra parte destinada a imunofenotipagem. Este estudo foi realizado em diferentes tempos (T0- antes da 1º dose de antígeno vacinal; T1- 14 dias após a última dose vacinal; T2 - 30 dias após o desafio, momentos antes da eutanásia).

Vinte e cinco microlitros deste sangue foi colocado em cada tubo de poliestireno sendo que para cada animal haviam quatro tubos, cada um contendo 20µL de cada anticorpo diluído (Tubo1: CD3/CD4/CD8, tubo2: CD3/CD49b, tubo3: CD19 e tubo4: CD14), haviam também os tubos de compensação (células sem marcação de anticorpos, FL1, FL3 e FL4 separados e FL1/FL3, FL4/FL3 e FL1/FL4). Após 30 minutos de incubação, foi feita a lise dos eritrócitos com 2mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, EUA) e intensa agitação no vórtex. Após 10

minutos foi adicionado 1mL de PBS-Wash (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1 % de azida sódica) em cada tubo seguida de centrifugação por 7 minutos a 1300rpm 18C°. O sobrenadante era então descartado e foi realizada uma etapa de lavagem utilizando 2mL de PBS-Wash e agitação no vórtex seguida de centrifugação por 7 minutos a 1300rpm 18C°. Em seguida foi realizado o descarte do sobrenadante e adicionado 200µL de solução fixadora Macs FACS Fix (10,0 g/L paraformaldeído, 10,2 g/L cacodilato de sódio e 6,65 g/L clorido sódio) para se realizar a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dicknson, San Diego, EUA), com aquisição de 15.000 eventos/tubo.

5.6.2 Análise, *ex vivo*, do fenótipo celular de leucócitos circulantes, por citometria de fluxo

A Figura 1 representa, de forma esquemática, o método utilizado para a análise do fenótipo celular dos leucócitos. Para a análise da imunofenotipagem celular, foi utilizado o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). A população de linfócitos totais foi selecionada a partir de um “gate” (R4) em gráfico de tamanho celular (Foward Scatter - FSC) x granulosidade (Side Scatter-SSC) (Figura 1A). Após a seleção da população de linfócitos totais, realizou-se a análise da intensidade de fluorescência 1 (células positivas para CD4) nos quadrantes Q5 e Q6 *versus* fluorescência 3 (células positivas para CD3) nos quadrantes Q6 e Q7 (Figura 1B) com intuito de analisar a população de linfócitos TCD3⁺CD4⁺. Para análise dos linfócitos TCD3⁺CD8⁺, foi realizada análise da intensidade de fluorescência 4 (células positivas para CD8) nos quadrantes Q1 e Q2 *versus* fluorescência 3 (células positivas para CD3) nos quadrantes Q2 e Q3 (Figura 1C). Os linfócitos B foram identificados através da análise da intensidade de fluorescência 1 (células positivas para CD19) no quadrante Q1 (Figura 1D). Para avaliar as células NK, primeiramente foi selecionada a população de células CD3⁻ através da análise da intensidade de fluorescência 3 (foram selecionadas as células negativas para CD3) (Figura 1E) e dentro desta população foi analisada as células CD49b⁺, através da análise da intensidade de fluorescência 1 (células positivas para CD49b), no quadrante Q3 (Figura 1F). A avaliação dos monócitos foi realizada através da construção de um gráfico de granulosidade (Side Scatter-SSC) *versus* análise da intensidade da fluorescência 1 (células positivas para CD14) (Figura 1G).

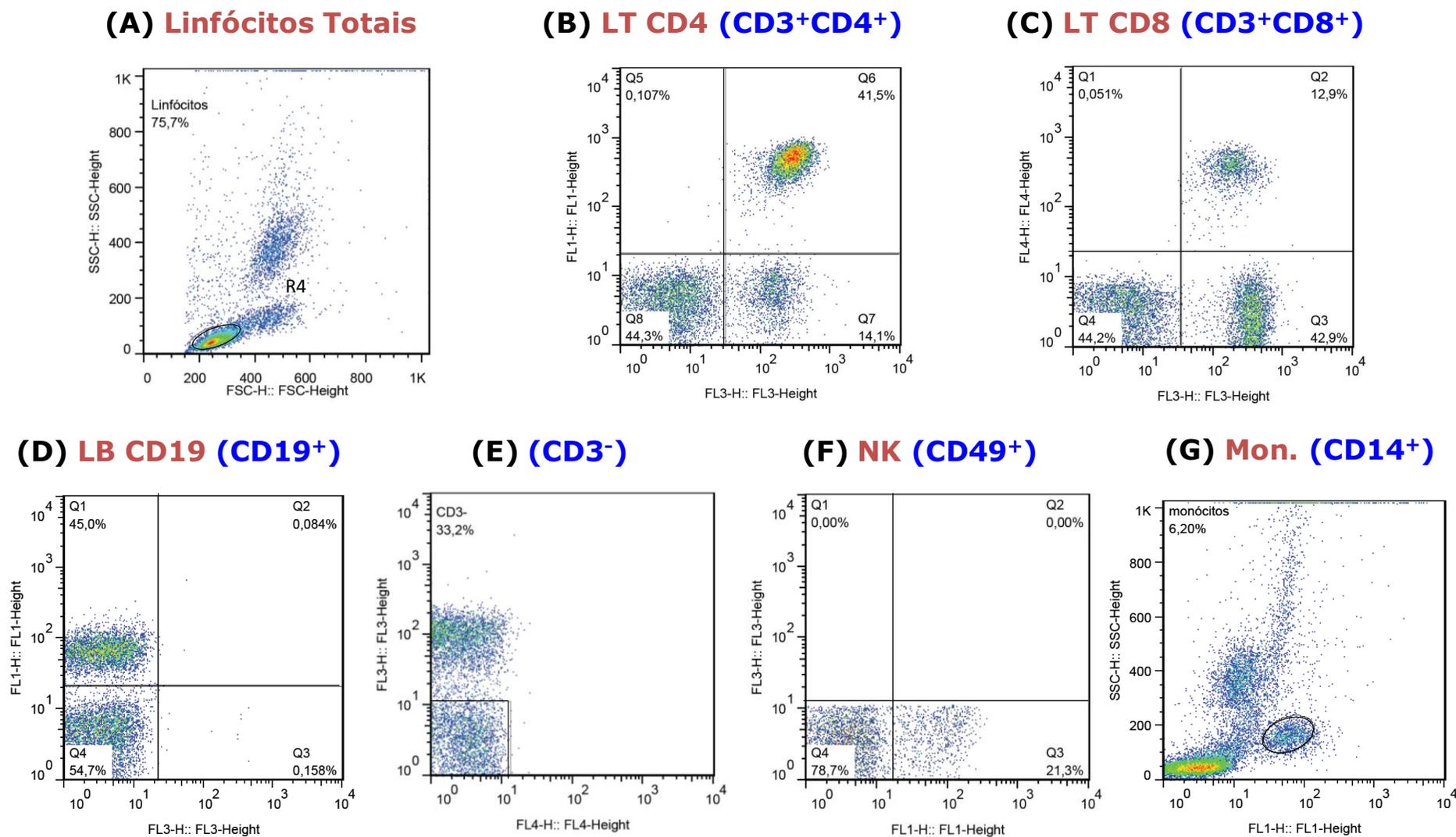


Figura 1: Análise da imunofenotipagem de leucócitos circulantes, pelo software Flow-Jo, para avaliação da população de linfócitos totais (A) por gráfico de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) x granulosidade (*Side Scatter*-SSC). (B) avaliação de linfócitos TCD3⁺CD4⁺ através do gráfico de FL1 x FL3 – Quadrante Q6; (C) avaliação de linfócitos TCD3⁺CD8⁺ através do gráfico FL4 x FL3 – Quadrante Q2; (D) avaliação de linfócitos B CD19⁺ através de gráfico FL1 x FL3 – Quadrante Q1; avaliação das células NK através da seleção de linfócitos CD3⁻ através do gráfico FL3 e FL4 (E) e análise das células CD49b⁺, através do gráfico FL3 x FL1 – Quadrante Q3 (F). Avaliação dos monócitos CD14⁺ através de gráficos de granulosidade (SSC) versus FL1 (G).

5.7 Análise Quantitativa da Carga Parasitária por *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

5.7.1 Extração do *Deoxyribonucleic acid* (DNA) de amostras de tecidos

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de baço e fígado conservadas em freezer -80°C. Deste modo, foi realizada a extração do DNA pelo kit Wizard® (PROMEGA) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, amostras de baço e de fígado foram pesadas de forma a se obter 20mg de cada tecido por animal. Estas amostras foram incubadas *overnight* com 500µl/amostra de solução de lise nuclear e 20µl/amostra de proteinase K (20mg/mL) a 55°C para digestão dos tecidos. Após a incubação foi adicionada 3µl da solução de RNase ao lisado nuclear, seguida de incubação a 37°C por 30 minutos. Após o resfriamento da amostra por 5 minutos em banho de gelo, foi adicionada 200µl de solução de precipitação proteica e intensa agitação no vórtex. A amostra foi então centrifugada por 4 minutos e meio a 16.000xg sendo observado um precipitado claro de proteínas. Desta forma, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo eppendorf já contendo 600 µl de Isopropanolol (CH₃CHOHCC₃), após homogeneização foi realizada uma nova centrifugação de 1 minuto e meio por 16.000xg. Após a centrifugação foi feita o descarte do sobrenadante e adicionado 200µl de Etanol 70% (ETOH) seguida de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos foram deixados abertos por 1h para que o Etanol evaporasse. Após este procedimento foi adicionado 200µl de solução de hidratação de DNA, seguida de homogeneização. As amostras foram deixadas por aproximadamente 24h a temperatura ambiente e após este período foram armazenadas em geladeira (4°C).

A dosagem do DNA das amostras foi realizada em nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus®, GE Healthcare, USA). Estas amostras foram armazenadas em geladeira (4°C) até o momento do uso.

5.7.2 Construção de curvas-padrão para qPCR e reação de qPCR

O produto da clonagem do gene de *L. infantum*, foi utilizado para a construção da curva-padrão. Os vetores contendo os insertos foram inicialmente dosados utilizando o equipamento Nanovue (GE Healthcare Bio Sciences AB Sweden) a 260nm e 280nm. A

partir da dosagem obtida, calculou-se a concentração de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de acordo com a fórmula:

$$\text{pmol}/\mu\text{L} = \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \frac{10^6 \text{pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{pmol}}{660 \text{pg}} \times \frac{1}{N}$$

Onde;

- N é o número de nucleotídeos (plasmídeo e inserto);
- 660pg é a massa molecular média de um ácido nucléico.

Levando-se em consideração o número de Avogadro: $1 \text{mol} = 6,02 \times 10^{23}$ moléculas, e sabendo-se que a concentração de cada solução de plasmídeo+inserto de interesse em $\text{pmol}/\mu\text{L}$, foi possível determinar o número de moléculas presentes por microlitro de cada amostra.

Depois de realizados os cálculos, as amostras foram diluídas sucessivamente, sendo que aquelas contendo de 10^7 até 10^0 moléculas foram utilizadas para a construção das curvas-padrão. As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp® Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Pesquisas Clínicas da Escola de Farmácia/UFOP.

Os controles positivos de cada placa foram às amostras diluídas de plasmídeo contendo o inserto utilizado na curva padrão; e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociassem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA); DNA ($5 \text{ng}/\mu\text{L}$); iniciadores ($5 \text{pmol}/\mu\text{L}$) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de $10 \mu\text{L}$ por poço. Desta forma, o par de

iniciadores utilizados (direto: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', e reverso: 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3') foi descrito por Bretagne *et al.* (2001) e tem como alvo o gene da DNA polimerase de *L. infantum* (acesso no GenBank: AF009147) que é um gene de cópia única e amplificam um fragmento de 90pb.

Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (Ct), calculada pelo programa *7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas dos plasmídeos com os insertos de interesse.

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação do gene de GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os iniciadores direto: 5' GTG AAG GTC GGT GTG AAC 3' e reverso: 5' CAA CAA TCT CCA CTT TGC 3'. As reações foram realizadas utilizando-se *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA); DNA (20ng/μL); iniciador (2,5 pmol/μL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10μL por poço. Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 98-100% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,99$).

5.8 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 6 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os testes de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram empregados para avaliação entre os grupos vacinais (análises imunofenotípicas e parasitológicas). Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *P* foi <0,05.

6. Resultados

6.1 Avaliação do local de inóculo, comportamento e peso dos animais vacinados

Como já foi relatado que a presença da saponina como adjuvante poderia induzir edema leve e nódulos não ulcerados no local do inóculo (Giunchetti, 2007), foi realizada a avaliação do local do inóculo em todos os grupos vacinais do presente estudo. Não foi observado nenhum tipo de nódulo, pápula ou úlcera. Os animais também não apresentaram nenhuma mudança de comportamento. Além disso, os camundongos foram pesados antes da 1^o dose vacinal, após as 3 doses de imunização e 30 dias após o desafio experimental e foi observado um aumento gradativo de peso (dados não mostrados) em todos os grupos, proveniente da progressiva idade dos animais nos tempos analisados.

6.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Com objetivo de avaliar os parâmetros hematológicos foi realizado uma análise da série vermelha no leitor hematológico e da série branca através da contagem diferencial de leucócitos. Estas avaliações foram feitas com o intuito de observar a cinética das populações celulares em diferentes tempos: antes das imunizações (T0), após as três doses de imunização (T1) e trinta dias após o desafio experimental por *L. chagasi* (T2).

Na avaliação da série vermelha, não foram observadas nenhuma alteração importante com relação ao número de plaquetas, hemácias, hemoglobina e hematócrito (dados não mostrados).

Com o propósito de se observar quais populações celulares estavam mais presentes nos tempos analisados, foi avaliado o perfil hematológico de leucócitos circulantes. Ao avaliar os componentes da imunidade inata, foi observado que o percentual de neutrófilos totais – segmentados e bastonetes, apresentou um aumento significativo no tempo T2 ($29 \pm 1,8$) com relação ao T1 ($21 \pm 2,2$) no grupo LT (Figura 2A). Ao avaliar o grupo LBSap foi identificada redução desta população celular no tempo T1 ($17 \pm 2,1$) com relação ao T0 ($30 \pm 3,6$) (Figura 2A). A análise das populações de monócitos (Figura 2B) e eosinófilos (Figura 2C) não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos vacinais. Cabe mencionar ainda que não foi encontrado basófilos no sangue destes camundongos.

Ao avaliar a população de linfócitos totais, foi observado um aumento no T1 ($74,5\pm 2,8$) com relação ao T0 ($64\pm 2,3$) no grupo LT (Figura 2D). Resultado semelhante foi observado ao se avaliar o grupo LBSap, que apresentou aumento desta população celular no T1 ($77\pm 1,7$) em relação ao T0 ($67\pm 2,1$). O aumento da população de linfócitos totais nos animais imunizados com as vacinas LT e a LBSap apontou a necessidade de se realizar um estudo mais detalhado relacionado a identificação das populações linfocitárias que poderiam contribuir para este aumento e ainda poderiam estar relacionadas ao estabelecimento de mecanismos imunoprotetores.

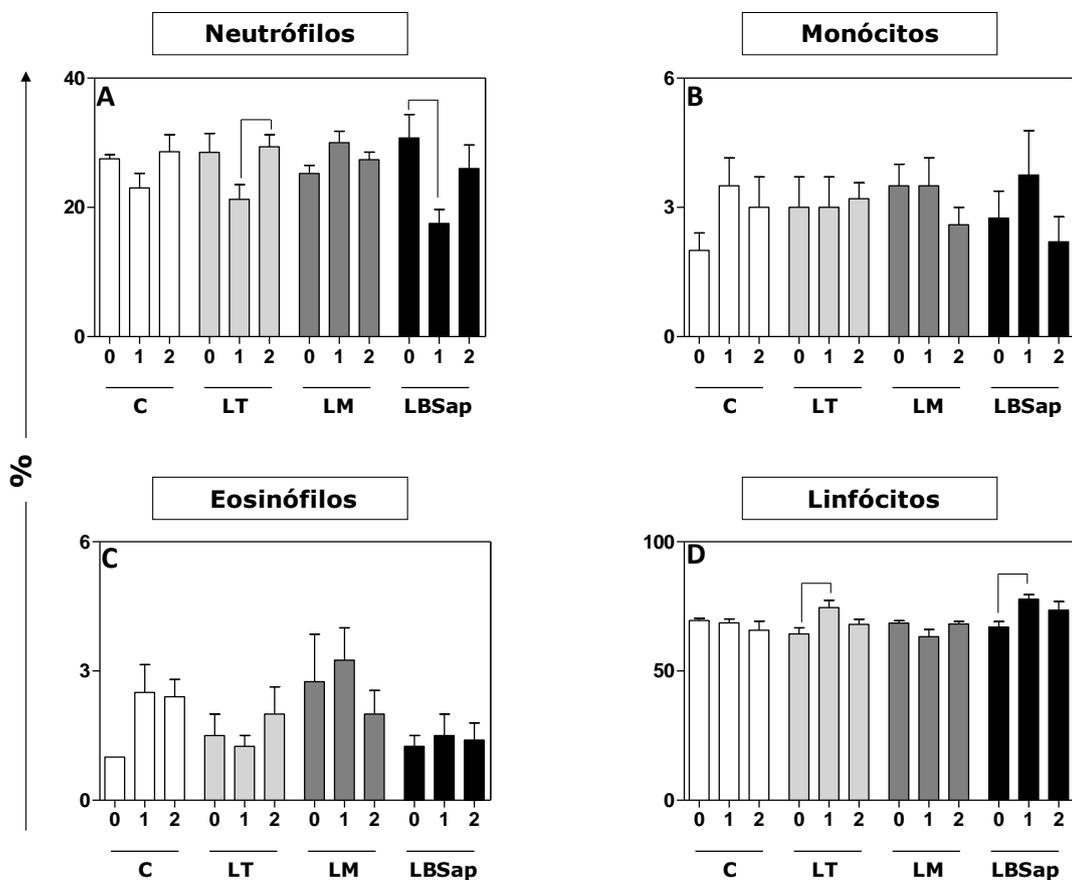


Figura 2: Perfil hematológico de leucócitos circulantes de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. Valores relativos (média±desvio padrão) do percentual da série branca da contagem diferencial de leucócitos nos tempos: T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após o desafio por *L. chagasi*. As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas através de linhas conectoras.

6.3 Estudo do perfil imunofenotípico *ex vivo* de leucócitos circulantes

Buscando ampliar as análises de imunogenicidade, neste estudo foram realizados ensaios para avaliar as frequências imunofenotípicas de leucócitos circulantes no contexto *ex vivo*. Esta análise buscou identificar a indução de um perfil imunofenotípico que pudesse estar relacionado a imunoproteção contra LV. Neste sentido, foram avaliadas células da imunidade inata: células NK e monócitos bem como células da imunidade adquirida: linfócitos T e suas subpopulações (T auxiliares e T citotóxicos) e linfócitos B. Estas avaliações foram empregadas com o objetivo de se avaliar a cinética do percentual destas populações celulares, em diferentes tempos: antes das imunizações (T0), após as três doses de imunização (T1) e trinta dias após o desafio (T2).

Ao avaliar as células NK ($CD3^-CD49b^+$), foi observado no grupo LT aumento em T2 (9 ± 1) com relação ao tempo T0 ($4\pm 0,5$) e T1 ($4\pm 0,8$) (Figura 3A). De forma semelhante, no grupo LM também foi observado aumento desta população celular em T2 ($10\pm 1,7$) quando comparados aos tempos T0 ($5\pm 0,5$) e T1 ($5\pm 0,5$) (Figura 3A). A análise do grupo LBSap revelou aumento no tempo T2 ($7\pm 1,1$) com relação ao T0 ($4\pm 0,5$) (Figura 3A).

A avaliação dos monócitos circulantes ($CD14^+$) no grupo LT demonstrou aumento gradativo dessas células quando comparamos o tempo T2 ($3\pm 0,05$) com os tempos T1 ($2\pm 0,1$) e T0 ($1\pm 0,2$) (Figura 3B). No grupo LM foi observado aumento em T1 ($3\pm 0,1$) com relação aos períodos de avaliação T0 ($2\pm 0,2$) e T2 ($2\pm 0,1$). A análise do grupo LBSap revelou aumento de monócitos $CD14^+$ em T1 ($2,6\pm 0,1$) quando comparado ao T2 ($2\pm 0,1$) (Figura 3B).

Com relação aos linfócitos B ($CD19^+$), foi observado que o grupo LBSap apresentou redução desta população celular em T1 ($36\pm 3,2$) e T2 ($28\pm 3,7$) quando comparados ao tempo T0 ($48\pm 2,9$) (Figura 3C).

Ao avaliar os linfócitos T totais ($CD3^+$) foi observado que o grupo LT apresentou um aumento do percentual destas células em T2 ($56\pm 1,8$) quando comparado ao T0 ($47\pm 2,1$). Além disso, foi observado que o grupo LBSap apresentou aumento de linfócitos T $CD3^+$ nos tempos T1 (53 ± 2) e T2 ($56\pm 3,8$) quando comparados ao tempo T0 ($46\pm 1,4$) (Figura 3D).

A avaliação dos linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) mostrou que esta subpopulação de linfócitos T é a mais expressiva. No grupo LT foi observado um aumento desta

população celular em T2 ($42 \pm 2,1$) com relação ao tempo T0 ($34,4 \pm 1,4$) (Figura 3F). Nos animais imunizados com a LM foi identificado aumento de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ em T2 ($49 \pm 2,4$) quando comparado aos períodos T0 ($42 \pm 1,2$) e T1 (41 ± 1) (Figura 3F). De forma semelhante, a análise no grupo LBSap revelou aumento de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ no T1 ($42 \pm 2,1$) e T2 ($41 \pm 1,6$) quando comparados ao T0 (33 ± 1) (Figura 3F). Ao avaliar os níveis de linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), não foi observado nenhuma diferença estatística nos diferentes tempos avaliados nos grupos vacinais. (Figura 3G).

Ao avaliar os valores de linfócitos T $CD3^+$ /linfócitos B $CD19^+$ (razão T/B), foi observado aumento no tempo T2 ($1,9 \pm 0,1$) com relação ao T0 ($1,1 \pm 0,08$) no grupo LT (Figura 4B). De forma interessante, o grupo LBSap apresentou aumento da razão T/B em T2 ($2 \pm 0,4$) quando comparado tanto ao T1 ($1,5 \pm 0,08$) como ao T0 ($0,9 \pm 0,04$) (Figura 4B). Foi realizada também análises da razão da subpopulação de linfócitos T $CD4^+$ /linfócitos T $CD8^+$, sendo observado aumento em T1 ($3,5 \pm 0,1$) e T2 ($3,6 \pm 0,1$) quando comparados ao T0 ($3,2 \pm 0,07$) do grupo LBSap (Figura 4B).

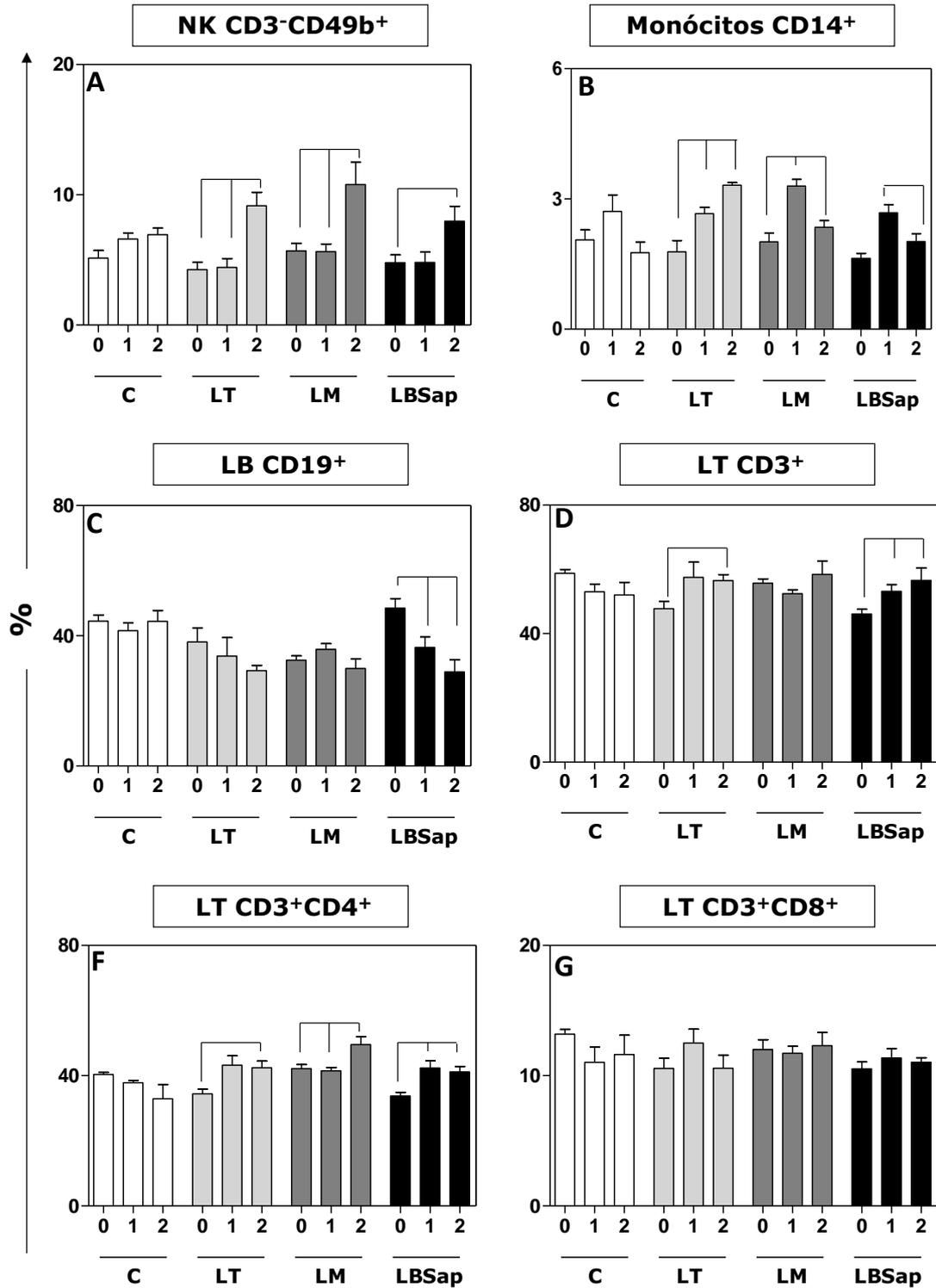


Figura 3: Percentual de leucócitos circulantes, obtidos através da imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após o desafio experimental por *L. chagasi*. Valores relativos (média±desvio padrão). As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas através de linhas conectoras.

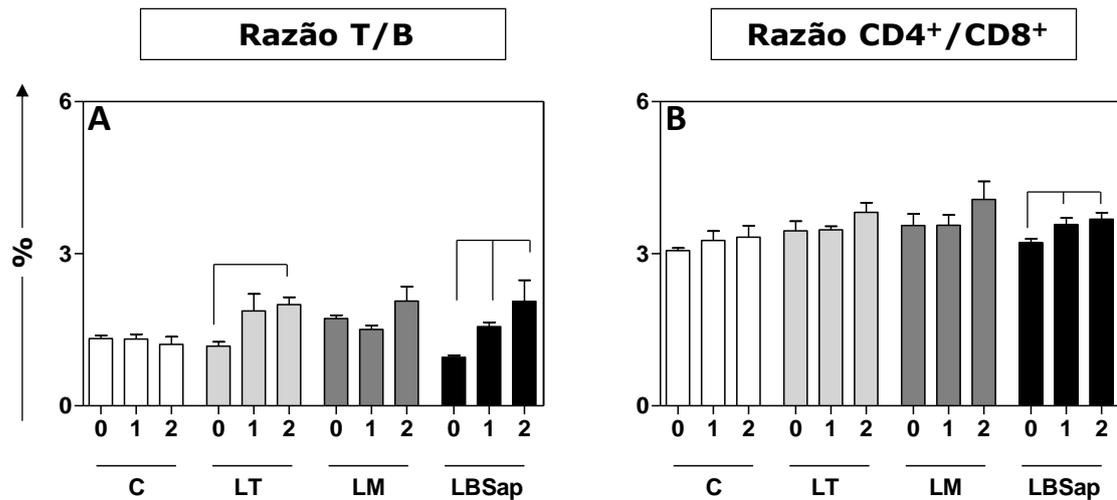


Figura 4: Percentual da razão dos valores de linfócitos T CD3⁺ e de linfócitos B CD19⁺ (A); e valores da razão dos valores de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ (B). Valores relativos (média±desvio padrão) de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. T0=antes da primeira imunização, T1=14 dias após 3^o e última dose vacinal e T2=30 dias após o desafio experimental por *L. chagasi*. As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas através de linhas conectoras.

6.4 Quantificação da carga parasitária tecidual por qPCR

As espécies de *Leishmania* com tropismo para as vísceras se propagam sistemicamente em macrófagos de órgãos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea (Miralles *et al.*, 1994; Engwerda *et al.*, 2004). Desta forma, a avaliação quantitativa por qPCR da carga parasitária do baço e do fígado é uma metodologia importante para se estimar a quantidade de amastigotas por miligrama de tecido. Neste sentido, 30 dias após o desafio experimental por *L.chagasi* foi realizada a eutanásia de todos os animais para a coleta do baço e do fígado que foram destinados a qPCR.

A análise da quantidade de amastigotas presentes no baço mostrou redução significativa de 63,3% no grupo LM (505±113,9) quando comparado com o grupo Controle (1376±317,7). Além disso, foi verificada uma tendência de redução de 36% e 42% nos grupos LT (881±259,4) e LBSap (799±193,1), respectivamente, entretanto esta redução não foi significativa.

Os resultados da carga parasitária no fígado mostraram redução significativa de 71% no grupo LM (162±22,8) e 62% no grupo LBSap (210±53,8) quando comparados ao grupo Controle (553±118,5). Além disso, o grupo LT (292±56,7) apresentou uma tendência de redução de 48% com relação ao grupo Controle (553±118,5), porém esta diferença não foi significativa. A avaliação do grupo LM (161,9±22,9) apresentou ainda uma redução significativa da carga parasitária de 45% quando comparado ao grupo LT (292,7±56,7).

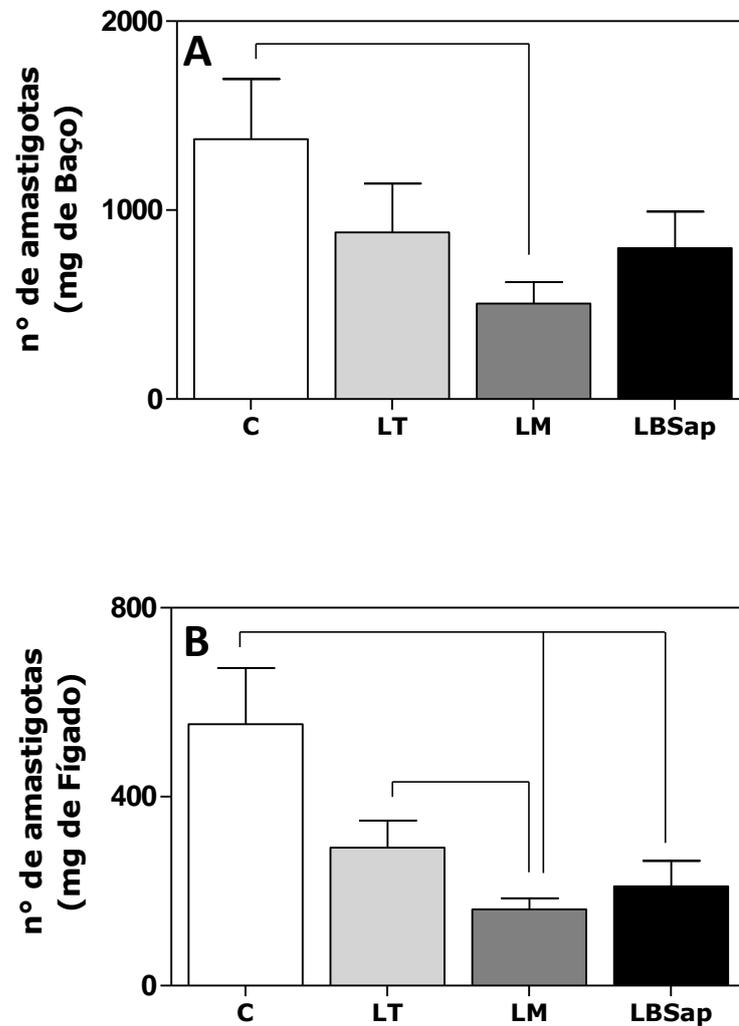


Figura 5: Quantidade de amastigotas por miligrama de tecido do baço (A) e do fígado (B) de camundongos submetidos a diferentes protocolos vacinais: Controle (C), Leish-Tec[®] (LT), Leishmune[®] (LM) e LBSap. A análise foi realizada 30 dias após o desafio experimental com *L. chagasi*. Valores absolutos (média±desvio padrão). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas através de linhas conectoras.

6.5 Resumo dos Resultados

Para facilitar a compreensão dos resultados, será representado um resumo dos principais resultados encontrados neste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo dos principais resultados obtidos 14 dias após as 3 doses de imunização (T1), trinta dias após o desafio experimental com *L. chagasi* (T2), bem como a avaliação da carga parasitária por qPCR.

Grupos experimentais	Após as imunizações (T1)	Após o desafio (T2)	Carga parasitária
Controle	–	–	–
Leish-Tec®	↑ Linf. Totais; CD14 ↓ Neut.	↑ Neut.; CD14; NK; CD3; CD4; razão T/B	tendência de ↓
Leishmune®	↑ CD14	↑ NK; CD4 ↓ CD14	↓ baço e fígado
LBSap	↑ Linf. Totais; CD14; CD3; CD4; razão CD4/CD8 ↓ Neut.; LB	↑ NK; CD3; CD4; razão T/B; e CD4/CD8 ↓ CD14; LB	↓ fígado e tendência ↓ baço

7. Discussão

Apesar do esforço despendido por diferentes grupos de pesquisa para identificação de uma vacina anti-LV, até o presente momento o Ministério da Saúde ainda não indica nenhum candidato vacinal para ser empregado na campanha de controle da LV em nosso país (Ministério da Saúde, 2006). Tais fatos nos mostram a importância de estudos que busquem o desenvolvimento de novos antígenos e protocolos vacinais contra LV, que poderão ser utilizados em futuras campanhas de controle desta doença. Sendo assim, tornam-se altamente relevantes estudos que utilizem a mesma plataforma de análise, dentro do mesmo ensaio pré-clínico vacinal, para avaliação do desempenho de candidatos vacinais em relação aos imunobiológicos comercialmente disponíveis em nosso país. Esta estratégia pretende contribuir para a análise comparativa do desempenho de candidatos vacinais considerando aspectos relacionados a imunogenicidade e eficácia vacinal, orientando o desenvolvimento de novos candidatos vacinais.

A primeira avaliação que deve ser realizada em ensaios pré-clínicos vacinais é a de segurança e inocuidade do imunobiológico empregado. Os componentes vacinais não podem induzir efeitos colaterais incompatíveis com a administração do produto testado. Neste sentido, estudos empregando a saponina como adjuvante relataram a presença de efeitos adversos em cães, entre os quais: perda de pelos no local do inóculo, anorexia, apatia, vômito e diarreia (Santos *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007; Rajput *et al.*, 2007). Já foi demonstrado também em estudos *in vitro*, que dependendo da dose de saponina utilizada, esta pode ter ação hemolítica. Entretanto, foi demonstrado que a remoção do radical glicosídico e da fração sapogenina da saponina proveniente da planta *Periandra mediterranea*, reduziu os efeitos hemolíticos deste adjuvante (Santos *et al.*, 1997).

Levando em consideração os efeitos colaterais causados pela saponina, neste estudo foi realizada uma avaliação macroscópica do local do inóculo, bem como acompanhamento do comportamento e peso dos animais imunizados. Desta forma, não foi observada nenhuma alteração nos animais inoculados com o adjuvante saponina, isoladamente ou combinado com os antígenos rA2, FML e LB. Estes dados corroboram com os estudos de Palatnik-de-Souza *et al.* (1994), Santos *et al.* (1997), Vitoriano-Souza *et al.* (2012), ao descreverem que camundongos também não apresentaram efeitos colaterais quando imunizados com a saponina. Estudos realizados pelo Laboratório de Imunopatologia/NUPEB/UFOP mostraram que após a inoculação da

saponina, em alguns cães foram observadas alterações discretas com a presença de edema ou nódulos não ulcerados no local do inóculo, estas alterações não prejudicaram a saúde dos animais imunizados (Giunchetti *et al.*, 2007, Roatt *et al.*, 2012).

Considerando que o adjuvante saponina apresenta-se como um excelente indutor da resposta celular, sendo utilizado amplamente em vacinas veterinárias (Rajput *et al.*, 2007), a ausência de alterações no local do inóculo e alterações hematológicas após administração da saponina suportam o uso deste adjuvante na área da medicina veterinária.

Uma das bases da imunização contra agentes infecciosos requer a participação da resposta imune inata. Neste sentido a ativação desta resposta mediada por diferentes tipos celulares (neutrófilos, células NK e macrófagos) são considerados importantes no direcionamento da resposta imune adaptativa (Kumar *et al.*, 2011; Giunchetti *et al.*, 2013). Desta forma, neste estudo a resposta imune inata sistêmica foi analisada pela contagem diferencial de leucócitos e por imunofenotipagem *ex vivo* em leucócitos circulantes.

Com relação aos dados do leucograma, foi observado um aumento de neutrófilos no grupo LT após o desafio experimental (T2) e redução desta população no grupo LBSap após o término do protocolo vacinal (T1). Alguns estudos demonstram que os neutrófilos podem induzir, através da secreção de mediadores inflamatórios e quimiocinas, recrutamento seletivo de leucócitos (van Gisbergen *et al.*, 2005). Em adição, os neutrófilos podem desempenhar um papel importante como veículo para transporte de antígenos para os linfonodos drenantes para posterior processamento e apresentação por células dendríticas (Bennouna *et al.*, 2003). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que a presença de neutrófilos pode favorecer a infecção por *Leishmania*. Neste sentido, após a infecção experimental ou natural por *L. major*, os neutrófilos são as primeiras células a serem mobilizadas e recrutadas para o local do inóculo. Estas células fagocitam os parasitos, sem no entanto apresentar mecanismos microbicidas que atuem no controle da infecção. Estes neutrófilos infectados agem então como “Cavalos de Tróia”, permitindo a entrada “silenciosa” de parasitos nos macrófagos (Peters *et al.*, 2008). Estudos realizados por Yang *et al.* (2010) mostraram o papel negativo de neutrófilos na resposta adaptativa por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B após a imunização com o antígeno HEL (lisozima de clara de ovo) associado a

diferentes adjuvantes. Esse trabalho mostrou que neutrófilos migram rapidamente para os linfonodos drenantes vindos do local da imunização através de vasos linfáticos, e essas células podem competir com células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) na captura de antígenos. Diante do exposto, fica clara a necessidade de se realizarem novos trabalhos para elucidar o papel de neutrófilos na imunoproteção induzida por vacinas contra infecções parasitárias (Leal, 2013).

No presente estudo foi identificado aumento das células NK, especialmente após o desafio experimental por *L. chagasi*, em todos os grupos vacinados (LT, LM e LBSap). Tem sido proposto que estas células tem a habilidade de iniciar a produção da citocina IL-12, favorecendo a produção de altos níveis de IFN- γ em macrófagos, que permite a indução da atividade leishmanicida e conseqüentemente o controle do parasitismo (Bogdan, 2012). Além disto, estas células possuem atividade lítica direta e sendo consideradas importantes no desenvolvimento de uma imunidade protetora contra diferentes patógenos intracelulares (Toledo *et al.*, 2010; Bogdan, 2012). Estes dados sugerem, que o aumento das células NK (CD3⁻CD49b⁺) observado nos grupos vacinais deste estudo, poderiam indicar a participação desta importante célula da imunidade inata no estabelecimento de mecanismos imunoprotetores, para favorecer o controle do parasitismo nos grupos LT, LM e LBSap.

Outra célula do sistema imune inato são os monócitos circulantes que podem se diferenciar em macrófagos em diferentes tecidos. Esta célula é extremamente importante para o controle da infecção, pois é capaz de realizar a fagocitose e induzir a morte de patógenos através da explosão respiratória, além de participar da produção de citocinas pró-inflamatórias, apresentação de antígenos a linfócitos T e B e secreção de proteínas da fase aguda e do sistema complemento (Soehnlein & Lindbom, 2010). Apesar dos inúmeros mecanismos de evasão que os diferentes patógenos intracelulares utilizam, as células do sistema imune inato possuem receptores que reconhecem padrões moleculares do parasito e podem ativar vários fatores de transcrição, desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas, que culminam na formação da resposta inflamatória à invasão tecidual (Kumar *et al.*, 2011). Na infecção por *Leishmania*, o receptor do tipo TLR2 (Toll Like Receptor 2), presentes em macrófagos e células dendríticas, podem ser acionados pelas moléculas de lipophosphoglycan (LPG), presentes no parasito e desta forma o TLR2 pode sinalizar a ativação do fator de

transcrição NF- κ B nos macrófagos e induzir a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (de Veer *et al.*, 2003). Neste sentido, a produção do IFN- γ por células da imunidade inata e adquirida induzem a produção de moléculas microbicidas pelos macrófagos, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Liew *et al.*, 1990; Vouldoukis *et al.*, 1996). No presente estudo, embora não tenham sido identificadas alterações no leucograma desta população celular, as análises da imunofenotipagem por citometria de fluxo mostraram que os monócitos (CD14⁺) aumentaram nos tempos T2 e T1 no grupo LT. Por outro lado, a vacina LM induziu aumento destas células em T1 e tanto esta vacina como a LBSap apresentaram redução de monócitos CD14⁺ em T2. A redução destas células no sangue circulante em T2 nos grupos LM e LBSap pode estar relacionada com a migração destas células para o tecido, favorecendo assim a redução de parasitos.

A imunoprofilaxia é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a melhor estratégia para o controle de doenças infecciosas, contribuindo para somar aos instrumentos de prevenção, por meio da eliminação do agente infeccioso e seus produtos tóxicos e ativação do sistema imune adaptativo (expansão de linfócitos T e B) atuando especificamente após exposição pelo patógeno (O'Hagan & Valiante, 2003). Assim, o presente estudo buscou a identificação de células importantes para o estabelecimento da resposta imune adaptativa, e que poderia atuar no sentido de favorecer o controle do parasitismo, como a população de linfócitos T totais (CD3⁺), e as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Neste sentido, em uma análise preliminar do percentual de linfócitos totais através do leucograma, foi observado neste estudo um aumento após as imunizações (T1) nos grupos LT e LBSap. O leucograma nos fornece somente os valores de linfócitos totais, pois através da microscopia óptica não tem como avaliar as diferentes subpopulações linfocitárias. Desta forma, observou-se a necessidade de se realizar uma avaliação mais detalhada para investigar outras alterações da imunidade adaptativa. Vale ressaltar que os estudos empregando-se como ferramenta a citometria de fluxo em camundongos imunizados com os antígenos comercialmente disponíveis contra a LVC são escassos. Deste modo, ao avaliar a literatura, não foi encontrado nenhum trabalho referente a avaliação da imunofenotipagem de leucócitos circulantes por citometria de fluxo em camundongos vacinados com as vacinas Leishmune[®] (Palatnik-de-Souza *et al.*, 1994;

Santos *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002; Oliveira-Freitas *et al.*, 2006) e Leish-Tec[®] (Zanin *et al.*, 2007; Gosh *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2003; Mizbani *et al.*, 2010).

Desta forma, este estudo avaliou a cinética das principais populações celulares envolvidas no estabelecimento da imunidade durante o processo vacinal e após a infecção por *L. chagasi*. Vale destacar ainda que o estudo dos imunobiológicos Leishmune[®] e Leish-Tec[®] teve como objetivo a inclusão de controles vacinais comerciais que permitissem avaliar o desempenho da vacina LBSap.

Ao avaliar antes (tempo T0) e após as 3 doses de imunização (T1) foi possível determinar aspectos relacionados a imunogenicidade induzida por estas vacinas. Além disto, foi possível avaliar se após o desafio experimental o perfil imunofenotípico seria mantido (T2). Neste contexto, foi observado no grupo LBSap após a vacinação (T1) e após o desafio (T2) uma redução de linfócitos B (CD19⁺) circulantes. É possível especular que esta redução esteja relacionada com a migração destas células para órgãos linfóides como o baço para ativação policlonal e produção de anticorpos. De fato, tem sido descrito na LVC que a redução do número de células B circulantes está diretamente relacionada com o intenso infiltrado plasmocitário observado em diversos tecidos (Giunchetti, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008; Giunchetti *et al.*, 2013). Estes resultados indicam a necessidade da avaliação dos níveis de anticorpos no soro dos camundongos avaliados no presente estudo, buscando avaliar a indução da resposta policlonal de linfócitos B no sentido de iniciar a produção de anticorpos vacinais. Vale destacar ainda que nosso grupo já descreveu que a vacina LBSap é capaz de induzir elevados níveis de IgG total anti-*Leishmania* em cães associado a redução de linfócitos B circulantes (Giunchetti, 2007; Giunchetti *et al.*, 2007). De acordo com Gosh *et al.* (2002), camundongos imunizados pelo antígeno rA2 e desafiados por *L. donovani* apresentaram altos títulos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Entretanto, já foi descrito que determinadas subclasses de anticorpos como: IgG2a e IgG2b são biomarcadores de uma resposta do tipo I e estão relacionados a resistência (Alexander & Brombacher, 2012). Em estudos conduzidos por Santos *et al.* (1999), observou-se que somente os animais imunizados com o antígeno FML apresentaram aumento de IgG2a e que a carga parasitária destes animais foi menor quando comparados com o grupo controle.

As avaliações relacionadas ao perfil imunofenotípico de células T e suas subpopulações permitiram a identificação de importantes alterações nos grupos

vacinados. Com relação aos linfócitos T CD4⁺ foi observado um aumento nos tempos T1 e T2 nos grupos LM e LBSap e no tempo T2 nos animais do grupo LT. Esta subpopulação de linfócitos foi a que mais contribuiu para o aumento dos níveis de linfócitos T totais (T CD3⁺) nos grupos LT e LBSap. Desta forma pode-se observar um mesmo padrão nos gráficos de LT CD3⁺ e de LT CD3⁺CD4⁺. O grupo LM não apresentou diferença significativa com relação aos níveis de LT CD3⁺, provavelmente em função do alto desvio padrão em T1. Uma vez que as células T de memória são críticas para induzir proteção contra a infecção em longo prazo (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2012) a manutenção dos níveis elevados de linfócitos T CD4⁺ após o desafio experimental, parecem favorecer a redução do parasitismo do fígado (LM e LBSap) e no baço (LM). Além disto, a indução de LT CD4⁺ em vacinas anti-LV tem sido associada a altos níveis de proteção, associada a capacidade destes linfócitos produzirem IFN- γ e promover a ativação dos macrófagos favorecendo a atividade leishmanicida (Coler *et al.*, 2007; Sánchez-Sampedro *et al.*, 2012, Kedzierska *et al.*, 2012).

Considerando as importantes alterações imunofenotípicas relatadas em linfócitos T e B circulantes, foi feita uma análise estatística que abordou as razões entre as populações e subpopulações linfocitárias para se investigar possíveis relações de cooperação celular durante o protocolo vacinal. A manutenção do aumento da razão de linfócitos T e B nos grupos LT e LBSap, após a infecção experimental, está relacionada com o aumento de linfócitos T CD3⁺ e consequente redução dos linfócitos B CD19⁺. Esta razão aumentada no T2 nas vacinas LT e LBSap (com forte tendência na vacina LM) poderia favorecer a redução do parasitismo tecidual observada. Com relação a razão de linfócitos T CD4⁺ *versus* T CD8⁺, foi observada um aumento no grupo LBSap nos tempos T1 e T2, relacionado ao aumento de linfócitos T CD4, já que os níveis de linfócitos T CD8 se mantiveram semelhantes durante a avaliação. Tem sido descrito para a vacina LBSap uma intensa indução de linfócitos T totais e de suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) após o protocolo vacinal (Giunchetti *et al.*, 2007) e que se mantém mesmo após longo período do desafio experimental em cães (Roatt *et al.*, 2012). Estes dados corroboram com a redução do parasitismo esplênico em cães vacinados com LBSap (Roatt *et al.*, 2012), indicando a contribuição destas populações celulares para o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores na vacina LBSap.

A quantificação de parasitos em camundongos experimentalmente infectados por *L. chagasi* é geralmente determinada por métodos clássicos como a Diluição Limitante e/ou *Leishman Donovan Units* (LDU), porém estas técnicas apresentam baixa sensibilidade (Moreira *et al.*, 2012; Mota, 2011, Mendonça, 2012). O desenvolvimento de uma técnica que permite a identificação das formas amastigotas em diferentes tecidos é extremamente importante para avaliar o impacto da imunização em camundongos desafiados experimentalmente. Atualmente, a técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem sido utilizada por diversos autores, com o propósito de diagnosticar e avaliar a evolução da LV através da quantificação de parasitos. A qPCR possui alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade (Ranasinghe *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2012; Roatt *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a técnica de qPCR foi utilizada para quantificar a carga parasitária por miligrama de tecidos (fígado e baço) nos diferentes grupos após o desafio experimental com 10^7 promastigotas de *L. chagasi*. Neste sentido, ao avaliar a carga parasitária no fígado, foi observada, redução significativa de 71% no grupo LM, 62% no grupo LBSap e tendência de redução de 48% no grupo LT. Provavelmente, este resultado não foi significativo no grupo LT devido ao alto valor do desvio padrão encontrado neste grupo.

Estudos conduzidos por Palatnik-de-Souza *et al.* (1994) demonstraram redução da carga parasitária no fígado de 84,4% em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno FML (150µg/dose) mais a saponina (150µg/dose) e desafiados por *L. donovani*. Outro trabalho apresentou uma redução de 85% a 89% no fígado de camundongos Swiss imunizados com o antígeno FML (150µg/dose) mais a saponina (100µg/dose) e desafiados experimentalmente por *L. donovani* (Santos *et al.*, 1999). Uma redução de parasitos no fígado de 73%, também foi observada por Santos *et al.* (2002) em camundongos Swiss imunizados com as mesmas concentrações de FML e saponina descritas acima. Os trabalhos descritos anteriormente utilizaram a metodologia de LDU para a quantificação da carga parasitária.

Com relação aos estudos realizados com o antígeno recombinante A2, camundongos BALB/c imunizados pela via intraperitoneal com a proteína recombinante A2 (10µg na primeira imunização e 5µg nas duas imunizações subsequentes) administrada juntamente com o adjuvante *Propianibacterium acnes* (100µg na primeira

dose e nas doses subsequentes apenas A2 com PBS) e infectadas por *L. donovani*, mostraram através da técnica de LDU uma redução de parasitos no fígado de 89% (Ghosh *et al.*, 2002). Em outro trabalho utilizando camundongos BALB/c imunizados intramuscularmente com 100µg de A2/DNA e experimentalmente infectados por *L. chagasi*, também foi observado redução significativa da carga parasitária no baço e no fígado (Zanin *et al.*, 2007).

Vale destacar que de acordo com o modelo experimental, torna-se necessário o ajuste de doses do antígeno bem como do adjuvante. Neste sentido, ao se comparar as quantidades de antígeno e adjuvante utilizados para imunização de cães, verifica-se que corresponde a cerca de 10% ao empregado para o modelo murino. Entretanto, variações no tipo de adjuvante (*Propianibacterium acnes*), esquema (dose crescente do antígeno; vacina de DNA) e via de administração do antígeno (intraperitoneal), linhagem do camundongo (Swiss), espécie e cepa do desafio experimental, bem como diferenças na sensibilidade das diferentes metodologias para diagnóstico parasitológico poderiam ser fatores determinantes para permitir discordâncias entre os resultados de eficácia vacinal encontrados neste estudo em relação aos de outros grupos de pesquisa.

Até o momento não existem estudos de eficácia vacinal da LBSap em camundongos. Desta forma, este trabalho possibilitou a comparação deste candidato vacinal com as vacinas comercialmente disponíveis e demonstrou que os níveis de eficácia foram compatíveis com as vacinas que já estão sendo comercializadas. Recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB/UFOP avaliou a carga parasitária, através da qPCR, em cães que foram imunizados com a LBSap. Neste estudo foi visto que os animais imunizados com três doses do antígeno LB (600µg) mais a saponina (1mg) e desafiados experimentalmente com *L. infantum*, apresentaram redução de 54% no baço quando comparados com o grupo controle (Roatt *et al.*, 2012). Considerando que a LBSap em cães tem se mostrado um promissor imunobiológico. Ensaios pareados utilizando candidatos vacinais em comparação com as vacinas comercialmente disponíveis Leishmune® e Leish-Tec® foram de fundamental importância para avaliar semelhanças e diferenças na eficácia vacinal e perfil imunofenotípico destes diferentes imunobiológicos.

A avaliação da carga parasitária no baço é frequentemente negligenciada em estudos de vacinas anti-LVC. Entretanto, este órgão pode ser um importante marcador

de eficácia vacinal. Vale ressaltar que vem sendo descrito em modelo murino que nas fases iniciais da infecção os parasitos se multiplicam em grande número no fígado, porém após aproximadamente quatro semanas a carga parasitária hepática tende a diminuir, enquanto o parasitismo no baço aumenta, sendo este órgão um local de persistência crônica dos parasitos (Wilson *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2005, Zanin *et al.*, 2007).

A vacinação tem sido considerada como a melhor alternativa para o controle das doenças infecciosas, por possuir um alto custo-benefício. Diferentes vacinas revelam-se muito eficazes no controle de infecções, como no caso da Varíola e da Póliomielite, que foram erradicadas em diferentes regiões do mundo (Paul, 2005). No entanto, há doenças, como as Leishmanioses, em que o desenvolvimento de estratégias vacinais parecer ser extremamente laborioso, dificultando a obtenção de vacinas indutoras de imunoproteção.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm buscado respostas para a prevenção da LVC, através da caracterização de antígenos de *Leishmania*. Apesar destes esforços, ainda não existe uma vacina que apresente eficácia vacinal compatível com o controle da LV e que seja recomendada como estratégia para o controle oficial desta doença (Ministério da Saúde, 2006; Kedzierski *et al.*, 2006).

Provavelmente, a dificuldade de obtenção de uma vacina que seja capaz de induzir elevados níveis de proteção, considerando parasitos do gênero *Leishmania*, esteja relacionada a alta complexidade e antigênicidade além dos inúmeros mecanismos de evasão do sistema imune no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado estes parasitos conseguem penetrar nas células de defesa e se multiplicar, sem que estas células sejam ativadas. Esta capacidade de evasão do sistema imune é atribuída a vários mecanismos que o parasito desenvolveu em sua evolução, como: mudanças de antígenos em sua superfície e mimetismo antigênico, eliminação de proteínas do seu revestimento, modulação do sistema imune inato e adquirido, entre outros (Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Shio *et al.*, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina que tenha eficácia de 100% seria racionalmente improvável. Entretanto, uma vacina que tenha altos níveis de proteção associada as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde poderiam reduzir consideravelmente a incidência da doença em áreas endêmicas para LV humana e canina.

8. Conclusões

O conjunto dos dados obtidos neste trabalho indicam que a saponina e os antígenos vacinais (rA2, FML e LB) foram inócuos e seguros para administração em camundongos. A estratégia de se avaliar simultaneamente diferentes antígenos vacinais em camundongos BALB/c permitiu identificar elementos da imunidade inata e adquirida envolvidos na resposta imune frente a infecção causada por *L. chagasi*. Neste sentido, foi observado que a imunização com as vacinas Leish-Tec[®], Leishmune[®] e LBSap induziram eventos relacionados a imunidade inata, com aumento de células NK (CD3⁻CD49b⁺), bem como mecanismos da imunidade adaptativa, como o aumento dos níveis de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ circulantes. Estes resultados parecem estar relacionados ao estabelecimento de mecanismos imunoprotetores compatíveis com a redução da carga parasitária no baço e fígado dos diferentes grupos avaliados.

9. Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos relacionados aos eventos imunoprotetores após a imunização com as vacinas Leish-Tec[®], Leishmune[®] e LBSap seguido do desafio experimental por *L. chagasi*. Desta forma, são propostas as seguintes perspectivas:

- Avaliar o perfil imune humoral anti-*Leishmania*, pela análise de diferentes imunoglobulinas (IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgE);
- Realizar a dosagem de nitrito e citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos, estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania*;
- Realizar o estudo do perfil imunofenotípico de esplenócitos e a dosagem de citocinas intracitoplasmáticas em culturas estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania*;
- Estudar alterações histológicas em fragmentos do baço e do fígado.

10. Referências Bibliográficas

- Alexander, J.; Brombacher, F. (2012). T helper1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Frontiers in immunology*, v.3(80), p.1-13.
- Almeida-Silva, L. (2002). Estudo Prospectivo de Indivíduos com Testes Imunológicos e Reação em Cadeia da Polimerase para Calazar em Porteirinha, Minas Gerais, Brasil, MSc Thesis, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba.
- Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. (2002). Animais de Laboratório: criação e experimentação. Editora Fiocruz, 1º Ed., 388p.
- Ashford, D.A.; Badaró, R.; Eulalio, C.; Freire, M.; Miranda, C.; Zalis, M.; David, J.R.; (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (Fast-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, p.1-8.
- Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p.1269-1281.
- Barbi, J.; Snider, H. M.; Bhardwaj, N.; Lezama-Dávila, C. M.; Durbin, J. E.; Satoskar, A. R. (2009). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (Fast-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Signal transducer and activator of transcription 1 in T cells plays an indispensable role in immunity to Leishmania major by mediating Th1 cell homing to the site of infection. FASEB J.*, v.23, p.3990–3999.
- Batista, F.D. e Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*, v.9, p.15-27.
- Baumgartner, K. e Malherbe, L.P. (2010). Regulation of CD4 T-cell receptor diversity by vaccine adjuvants. *Immunology*, v.130, p.16-22.
- Bennouna, S.; Bliss, S.K.; Curiel, T.J.; Denkers, E.Y. (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.*, v.171, p.6052–6058.

- Biagi, F. (1953). Algunos comentarios sobre las leishmanioses y sus agentes etiológicos. *Leishmania tropica mexicana*, nueva sub-espécie. *Medicine* 33: 401–406.
- Blackwell, J.M.; Fakiola, M.; Ibrahim, M.E.; Jamieson, S.E.; Jeronimo, S.B. et al. (2009). Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.*, v.31(5), p.254-266.
- Bogdan, C. (2012). Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.2(69), p.1-9.
- Borja-Cabrera, G.P.; Correia Pontes, N.N.; da Silva, V.O. et al. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, v.20(27-28), p.3277–3284.
- Bretagne, S.; Durand, R.; Olivi, M.; Garin, J.F.; Sulahian, A.; Rivollet, D.; Vidaud, M.; Deniau. (2001). Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.8(4), p.828-831.
- Chagas, E.; Cunha, A.M.; Ferreira, L.C. et al. (1937). Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.33, p.189-229.
- Charest, H. e Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.*, v.14(5), p.2975–84.
- Coelho, E.A.; Tavares, C.A.; Carvalho, F.A.; Chaves, K.F.; Teixeira, K.N.; Rodrigues, R.C.; Charest, H.; Matlashewski, G.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P. (2003). Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.*, v.71, p.988–994.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, v.33(4), p.492-503.

- Coler, R.N. e Reed, S.T. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology (Review)*, v.21(5), p.244-249.
- Coler, R.N.; Goto, Y.; Bogatzki, L.; Raman, V.; Reed, S. (2007). Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4+ T Cells. *Infection and Immunity*, v.75(9), p.4648-4654.
- Costa, N.; Peters N.C.; Maruyama, S.R. et al. (2011). Vaccines for the Leishmaniasis: Proposals for a Research Agenda. *Plos Neg. Trop. Dis.*, v.943(5), p.1-9.
- Cram, L.S. (2002). Flow cytometry, an overview. *Methods in Cell Science*, v.24, p.1-9.
- Cunha, A.M. e Chagas, E. (1937). Estudos sobre o parasito. In: *Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.32, p.329-337.
- Cunningham, A.C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v.72, p.132-141.
- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.*, v.141, p.1-8.
- Deak, E.; Jayakumar, A.; Cho, K.W.; Goldsmith-Pestana, K.; Dondji, B.; Lambris, J.D.; McMahon-Pratt. Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. (2010). *Eur. J. Immunol.*, v.40(5), p.1355-1368.
- Deane, L.M. (1956). *Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará (Tese de Doutorado em Parasitologia)*. Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 162p.
- Deane, L.M. e Deane, M.P. (1962). Visceral leishmaniosis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.4, p.149-212.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, p.305-318.

- Engwerda, C.R.; Ato, M.; Kaye, P.M. (2004) Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v.20, p.524–530.
- Fernandes, A.P.; Coelho, E.A.; Machado-Coelho, G.L.; Grimaldi, G. Jr.; Gazzinelli, R.T. (2012). Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.15(4), p.476-485.
- Fernandes, A.P.; Costa, M.M.S.; Coelho, E.A.F; Michalick, M.S.; Freitas, E.; Gazzinelli, R.T. et al. (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v.26, p.5888-5895.
- Garg, R. e Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, v.123, p.439-454.
- Genaro, O.; Pinto, J.A.; Da Costa, C.A.; França Silva, J.C.; Costa, R.T.; Silva, J.C.; Mayrink, W. (1996). Phase III randomized double blind clinical trial of the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.91, p.166.
- Ghosh, A.; Zhang, W.W.; Matlashewski, G. (2002). Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, v.20, p.59-66.
- Giunchetti, R.C. (2004). Influência do parasitismo sobre os aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral canina (Dissertação de Mestrado em Imunoparasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 101p.
- Giunchetti, R.C. (2007). Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra Leishmaniose Visceral Canina (Dissertação de Doutorado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 233p.
- Giunchetti, R.C.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Vitoriano-Souza, J.; Moreira, N.D.; Malaquias, L.C.;

- Castro, L.L.M.; Lana, M.; Reis, A.B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v.25(44), p.7674-86.
- Giunchetti, R.C.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Coura-Vital, W.; Abreu, R.T.; Malaquias, L.C.; Gontijo, N.F.; Brodskyn, C.; Oliveira, C.I.; Costa, D.J.; Lana, M.; Reis, A.B. (2008b). A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, v.26(5), p.623-638.
- Giunchetti, R.C.; Coura-Vital, W.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Vitoriano-de-Souza, J.; Moreira, N.D.; Resende, L.A.; Viana, K.F.; Mendonça, L.Z.; Lanna, M.F. et al. (2013). Biomarkers for canine visceral leishmaniasis and their employment in vaccines. *In press*.
- Giunchetti, R.C.; Coura-Vital, W.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Vitoriano-de-Souza, J.; Moreira, N.D.; Resende, L.A.; Viana, K.F.; Mendonça, L.Z.; Reis, A.B. et al. (2013). Biomarkers for canine visceral leishmaniasis and their employment in vaccines. *Rev. Bras. Med. Trop.* Aceito para publicação.
- Giunchetti, R.C.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Carneiro, C.M.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Marques, M.J.; Tafuri, W.L.; Reis, A.B. (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.*, v.135, p.100-107.
- Giunchetti, R.C.; Reis, A.B.; Silveira-Lemos, D.; Martins-Filho, O.A.; Corrêa-Oliveira, R.; Bethony, J.; Vale, A.M.; Quetz, J.; Bueno, L.L.; França-Silva, J.C.; Nascimento, E.; Mayrink, W.; Fujiwara, R.T. (2008a). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Rev. Vet. Sci.*, v 85(1), p.106-112.
- Gradoni, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.*, v.100, p.87-103.
- Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v.126, p.131-138.

- Harhay, M.O.; Olliaro, P.L.; Costa, D.L.; Nery-Costa, C.H. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, v.27(9), p.403-409.
- Heinzel, F.P.; Sadick, M.D.; Holaday, B.J.; Coffman, R.L.; Locksley, R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, v.169, p.59-72.
- Kaye, P. e Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the hostpathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.9, p.604-615.
- Kaye, P.M.; Svensson, M.; Ato, M.; Maroof, A.; Polley, R.; Stager, S.; Zubairi, S.; Engwerda, C.R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev.*, v.201, p.239-253.
- Kedzierska, K.; Curtis, J.M.; Valkenburg, S.A.; Hatton, L.A.; Kiu, H.; Doherty, P.C.; Kedzierska, L. (2012). Induction of Protective CD4+ T Cell-Mediated Immunity by a Leishmania Peptide Delivered in Recombinant Influenza Viruses. *Plos One*, v.7(3), e33161.
- Kedzierski, L.; Zhu, Y.; Handman, E. (2006). Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*, v.133, p.S87-S112.
- Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M.; Killick-Kendrick, C.; Focheux, J.; Dereure, M.; Puech, P.; Cadiègues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomus sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.11, p.15-21.
- Kirkpatrick, C.E. e Farrell, J.P. (1982). Leishmaniasis in beige mice. *Infect. Immun.*, v.38, p.1208-1216.
- Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, v.30, p.16-34.
- Kumar, R. e Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunol.*, v.3(251), p.1-10.

- Laison, R e Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick-Dendrick. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press, v.1, p.1-20.
- Laveran, A. e Mesnil, F. (1903). Sur um protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d` une fièwre de l`Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-961.
- Leal, G.G.A. (2013). Biomarcadores de resistência e suscetibilidade a leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* provenientes de área endêmica (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Nucleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, 90p.
- Leclercq, V.; Lebastard, M.; Belkaid, Y.; Louis, J.; Milon, G. (1996). The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J. Immunol.*, v.157, p.4537–4545.
- Lemesre, J.P.; Holzmuller, P.; Gonçalves, R.B.; et al. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, v.25, p.4223-4234.
- Liew, F.Y.; Millot, S.; Parkinson, C.; Palmer, R.M.; Moncada, S. (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.*, v.144(12), p.4794-7.
- Lipoldova, M. e Demant, P. (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet.*, v.7, p.294-305.
- Liu, G.; Anderson, C.; Scaltreto, H.; Barbon, J.; Kensil, C.R. (2002) QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*, v.20(21-22), p. 2808-2815.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275.

- Machado Braga, M.D.; Coelho, I.C.B.; Lima Pompeu, M.; Evans, T.G.; Tavares, M.I.; Teixeira, M.J.; Oliveira Lima, J.W. (1998). Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, p.419-424.
- Magalhães, P.A.; Mayrink, W.; Costa, C.A.; Melo M.N.; Dias, M.; Batista, S.M.; Michalick, M.S.M.; Williams, P. (1980). Calazar na zona do Rio Doce-Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.22, p.197-202.
- Maia, C.; Seblova, V.; Sadlova, J.; Votypka, J.; Volf, P. (2011) Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v.5: e1181.
- Mauel, J. (2002). Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr. Drug. Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.*, v.2, p.201-226.
- Maurício, I.L.; Stothard, J.R.; Miles, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v.16(5), p.188-189.
- Mayrink, W.; Genaro, O.; Silva, J.C.; da Costa, R.T.; Tafuri, W.L.; Toledo, V.P.; da Silva, A.R.; Reis, A.B.; Williams, P.; da Costa, P.W. (1996). Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.91, p.695-697, 1996.
- McMahon-Pratt, D. e Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol. Rev.*, v.201, p.206-224.
- Melby, P.; Yang, Y.; Cheng, J.; Zhao, W. (1998). Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, v.66 p.18-27.
- Mendonça, C.A. (2011). Avaliação da proteção da vacina LBSapSal contra leishmaniose Visceral Canina, frente ao desafio intradérmico experimental com *Leishmania chagasi* e

- extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ouro Preto: Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, 87p.
- Ministério da Saúde. (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. 1º edição. 122p.
- Miralles, D.G.; Stoeckle, M.Y; McDermott, D.F; Finkelman, F.D., Murray, H.W. (1994). Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v.62(3), p.1058-1063.
- Mizbani, A.; Taheri, T.; Zahedifard, F.; Taslimi, Y.; Azizi, H.; Rafati, S. et al. (2010). Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.28, p.53-62.
- Moreira, N.D.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, C.M.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, B.M.; Malaquias, L.C.; Corrêa-Oliveira, R.; Reis, A.B. (2009). Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128(4), p.418-424.
- Moreira, N.D.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, B.M.; Vieira, P.M.A.; Ker, H.G.; Cardoso, J.M.O.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Reis, A.B. (2012). Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *Plos One*, v.7(10), e47907.
- Moreno, J.; Vouldoukis, I.; Martin, V.; McGahie, D.; Cuisinier, A.M.; Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *Plos. Negl. Trop. Dis.* v.6(6), e1683.
- Mosmann, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M.W. et al. (1986). Two types of murine helper T cell clone 1. *J. Immunol.*, v.136, p.2348-2357.
- Motta, C.B. (2011). Emprego de Diferentes Metodologias Diagnósticas na Avaliação da Proteção da Vacina LBSap contra Leishmaniose Visceral Canina frente ao desafio experimental intradérmico com Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* e

- extrato de Glândulas Salivares de *Lutzomyia longipalpis* (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ouro Preto: Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, 79p.
- Murray, H.W. (1997). Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v.175, p.1477–1479.
- Murray, H.W.; Berman, J.D.; Davies, C.R.; Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v.366, p.1561–1577.
- Murray, H.W.; Stern, J.J.; Welte, K.; Rubin, P.O.R; Carriero, S.M.; Nathan, C.F. (1987). Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J. Immunol.*, v.138(7), p.2290-2297.
- Neogy, A.B.; Vouldoukis, I.; Da Costa, J.M.; Monjour, L. (1994). Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Group of Lupino. Vet. Parasitol.*, v.54, p.367-373.
- Nicolle, C.H. (1908). Culture des corps de Leishman isolés de La rate dans trois cas d'anémie splénique infantile. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.1, p.121.
- Nogueira, F.S.; Moreira, M.A.; Borja-Cabrera, G.P.; Santos, F.N. et al.. (2005). Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, v.23(40), p.4805-10.
- Noli, C. e Auxilia, S.T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.*, v.16, p.213-232.
- O'Hagan, D.T. e Valiante, N.M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccines adjuvants. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v.2, p.727-735.
- Oliveira-Freitas, E.; Casas, C.P.; Borja-Cabrera, G.P.; Santos, F.N.; Palatnik-de-Souza, C. et al. (2006). Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as

- adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.24, p.3909-3920.
- Palatnik-de-Souza, C.B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, v.26(14), p.1709-1724.
- Palatnik-de-Souza, C.B.; Dutra, H.S.; Borojevic, R. (1993). *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose Mannose Ligand (FML). *Acta Trop.*, v.53(1), p.59–72.
- Palatnik-de-Souza, C.B.; Paraguai-de-Souza, E.; Gomes, E.M.; Borojevic, R. (1994). Experimental murine *L. donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). *Brazilian J. M. Biol. Res.*, v.27, p.547-551.
- Parra, L.E.; Borja-Cabrera, G.P.; Souza, L.O.; Palatnik-de-Souza, C.B.; Menz, I. (2007). Safety Trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, v.25, p.2180-2186).
- Passa, S.; Toz, S.O.; Voyvoda, H.; Ozbel, Y. (2005). Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.*, v.128, p.243-249.
- Paul, Y. (2005). Polio Eradication: Let us Face the Facts and Accept the Reality. *Indian Pediatrics*, v.42, p.728–729.
- Pereira, M.G. (1995). *Epidemiologia - teoria e prática*. Ed. Guanabara Koogan p.316.
- Rajput, Z.I.; Hu, S.H.; Xiao, C.W.; Arijo, A.G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune response. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, v.B8, p. 153-161.
- Ranasinghe, S.; Rogers, M.E.; Hamilton, J.G.C.; Bates, P.A.; Maingon, R.D.C. (2008). A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Royal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.102, p.875-882.
- Reis A.B.; Giunchetti, R.C.; Carrilo, E.; Martins-Filho, O.A.; Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v.26(7), p.341-349.

- Reis, A.B. (2001). Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção (Tese, Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2001, 180p.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J.; Giunchetti, R.C.; Mayrink, W.; Guerra, L.L.; Andrade, R.A.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A. (2006b). Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.112, p.102-116.
- Reis, A.B.; Carneiro, C.M.; Carvalho, M.G.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R.C.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A. (2005) Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.103, p.173-185.
- Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M.G.; Mayrink, W.; França-Silva, J.C.; Giunchetti, R.C.; Genaro, O.; Corrêa-Oliveira, R. (2006a). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sc.*, v.81, p.68-75.
- Reis, A.B.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R.C.; Guerra, L.L.; Carvalho M.G.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Corrêa-Oliveira R; Martins-Filho O.A. (2006c). Phenotypic features of circulating leukocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v.146, p.303–311.
- Resende, D.M.; Caetano, B.C.; Dutra, M S. *et al.* (2008). Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine*, v.26, p.4585-4593.
- Resende, L.A. (2011). Perfil de Citocinas e Níveis de Óxido Nítrico em Cães Vacinados com os Imunobiológicos LBSap e LBSapSal e Submetidos ao Desafio Experimental

- com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e saliva de *Lutzomyia longipalpis*. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia). Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 106p.
- Roatt, B.M. (2010). Imunogenicidade e Eficácia da Vacina LBSap em Cães Após Desafio Intradérmico com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Extrato de Glândula Salivar de *Lutzomyia longipalpis*.(Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 131p.
- Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Vitoriano-Souza, J.; Coura-Vital, W. et al (2012). Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *Plos One*, v.7(11), p.1-12.
- Rolão, N.; Melo, C.; Campino, L. (2004). Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta. Trop.*,v.90, p.123–126.
- Ronet, C.;Hauyon-LaTorre,Y.; Revaz-Breton, M.; Mastelic, B.; Tacchini Cottier, F.; Louis,J.; and Launois, P.(2010).Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responsesin BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL- 10 production. *J. Immunol.*, v.184, p.886–894.
- Sacks, D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.*, v.69, p.100-103.
- Sánchez-Sampedro, L.; Gómez, C.E.; Mejías-Pérez, E.; Sorzano, C.O.; Esteban, M. (2012). High quality long-term CD4⁺ and CD8⁺ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. *Plos One*, v.7(6), e38859.
- Santos, W.R.; Bernardo, R.R.; Peçanha, L.M.T.; Palatnik, M.; Parente, J.P.; Palatnik-de-Souza, C. (1997). Haemolytic activities and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *L. donovani*. *Vaccine*, v.15(9), p.1024-1029.

- Santos, W.R.; Edilma, P.S.; Palatnik, M. et al. (1999). Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v.17, p.2554-2561.
- Santos, W.R.; Lima, V.M.F.; Souza, E.P. (2002). Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.21, p.30-43.
- Saridomichelakis, M.N.; Mylonakis, M.E.; Leontides, L.S. et al. (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet. Parasit.*, v.130, p.199-205.
- Shio, M.T.; Hassani, K.; Isnard, A.; Ralph, B., Contreras, I.; Gomez, M.A.; Abu-Dayyeh, I.; Olivier, M. (2012). Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J. Trop. Med.*, v.2012, p.1-14.
- Singh B. e Sundar S. (2012). Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, v.30(26), p.3834-3842.
- Singh, R.K.; Pandey, H.P.; Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (Kala-azar): Challenges ahead (Review). *Indian J. Med. Res.*, v.123, p.331-344.
- Smelt, S.C.; Cotterell, S.E.; Engwerda, C.R.; Kaye, P.M. (1997). B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J. Immunol.*, v.164(7), p.3681-8.
- Smelt, S.C.; Engweda, C.R.; McCrossen, M.; Kaye, P.M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, v.158, p.3813-3821.
- Soehnlein, O. e Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 10, p.427-439.
- Spickler, A.R e Roth, J.A. (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J. Vet. Intern. Med.*, v.17(3), p.273-281.
- Stanley, A.C. e Engwerda, C.R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol.*, v.85, p.138-147.

- Sundar, S. e Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.9, p.951–958.
- Sundar, S.; Sahu, M.; Mehta, H.; Gupta, A.; Kohli, U.; Rai, M.; Berman, J.D.; Murray, H.W. (2002). Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigens strip testing at a kala-azar referral unit. *Clin. Infect. Dis.*, v.35, p.581–586.
- Tesh, R. (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.52, p.287–92.
- Toledo, V.P.C.P.; Sathler-Avelar; Vitelli-Avelar, D.M.; Peruhype-Magalhaes, V.; Silveira-Lemos, D.; Campi-Azevedo, A.C.; Andrade, C.M.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins Filho, O. (2010). *Natural Killer Cells: At the Forefront of Modern Immunology*. 1. ed. Springer, v.1, 428p.
- van Gisbergen, K.P.; Sanchez-Hernandez, M.; Geijtenbeek, T.B.H.; van Kooyk, Y. (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.*, v.201, p.1281–1292.
- Vitoriano-Souza, J.; Moreira, N.D.; Teixeira-Carvalho, A.; Carneiro, C.M.; Siqueira, F.A.M.; Vieira, P.M.A.; Giunchetti, R.C.; Moura, S.A.L.; Fujiwara, R.T.; Melo, M.N.; Reis, A.B. (2012). Cell Recruitment and Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freund's Adjuvant and Monophosphoryl Lipid A. *Plos One*, v.7, p.
- Vitoriano-Souza, J.; Reis, A.B.; Moreira, N.D.; Giunchetti, R.C.; Correa-Oliveira, R.; Carneiro, C.M. (2008). Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine*, v.26(31), p.3922-3931.
- Vouldoukis, I.; Drapier, J.C; Nussler, A.K.; Tselentis, Y; Dugas, B. et al. (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial

- activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40(1), p.253-256.
- Vouldoukis, I.; Rougier, S.; Dugas et al. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparasion of in vitro leishmanicidal activity of merboflaxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.*, v.135, p.137-146.
- Weiner, D.B. e Kennedy, R.C. (1999). Genetic Vaccines. *Sci. Am.*, v.281, p. 50-57.
- WHO (World Health Organization). (2012). Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em: 03/02/2013.
- Wilson, M.E.; Jeronimo, S.M.; Pearson, R.D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathog.*, v.38, p.147-160.
- Wilson, M.E.; Sandor, M.; Blum, A.M.; Young, B.M.; Metwali, A.; Elliott, D.; Lynch, R.G.; Weinstock, J.V. (1996). Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, v.156, p.2231-2239.
- Yang, C.W.; Strong, B.S.; Miller, M.J.; Unanue, E.R. (2010). Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol* 185(5): 2927-2934.
- Zambrano-Villa, S.; Rosales-Borjas, D.; Carrero, J.C.; Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.*, v.18(6), p.272-278.
- Zanin, F.H.C.; Coelho, E.A.F.; Tavares, C.A.P. et al. (2007). Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes and Infection*, v.9, p.1070-1077.
- Zhang, W. e Matlashewski, G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.94, p.8807-11.
- Zhu, J. e Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, v.20, p.4-12.

11. Anexo

Certificado de Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 2011/13, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "Análise comparativa de imunogenicidade e eficácia empregando-se o candidato vacinal KMP-11 e as vacinas LBSap, Leishmune, Leish-Tec em uma plataforma de testes *in vivo*" e que tem como responsável o Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti a foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em abril/2013.

Ouro Preto, 28 de março de 2011.


Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP