

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

UTILIZAÇÃO DE DNA p36(LACK) NA INDUÇÃO DE
RESPOSTA IMUNE E NA PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO
POR *Leishmania chagasi* EM CAMUNDONGOS BALB/c

AUTOR: EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA
ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE APARECIDA REZENDE
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS CARLOS CROCCO AFONSO
COLABORADORA: PROFA. DRA. ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, abril de 2004

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob a orientação da Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende e co-orientação do Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho àqueles dos quais fiquei distante durante a sua realização.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por estar acima de tudo, e em cujas mãos eu procuro entregar o direcionamento de todas as minhas decisões.

À Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende e ao Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, pelo excelente convívio, pela orientação e por terem me acolhido em seu laboratório da melhor maneira possível, sendo ótimos exemplos como pessoas e como pesquisadores.

Aos meus amigos do LIP (Laura, Tatiani, Juciane, Amanda, Roberta, Érica, Juliana, Tiago, Leandro e a Profa. Dra. Beatriz Stransky). Aos amigos dos outros laboratórios, em especial: Léo, Marquinhos, Michelle, Wander, Daniele e Hebert (meus colegas de mestrado), Marcelo, Regina, Helaine, Totola e Ezequiel, e aos amigos do biotério, pela ótima convivência.

Aos Profs. Drs. Deoclécio Chianca Jr., Milton Hércules, Ieso de Miranda Castro, Rogélio Lopes Brandão, Maria Terezinha Bahia e aos Drs. Luciano e Juliana Fietto, pela constante disponibilidade em ajudar.

À Cida, que é, acima de tudo, uma excelente profissional e uma unanimidade por ser reconhecida como uma pessoa sempre disponível e dedicada ao trabalho e que cultivava um ótimo relacionamento com todos.

Agradecimentos Especiais

À minha família, que hoje tenho multiplicada por 3: meus pais (Marcinho e Lucinha) e meus irmãos (Alexandre e Biba), que são a minha sustentação, a minha esposa, Emília, que, com muito amor, dividiu comigo todos os momentos bons e difíceis desse trabalho, e a família da Emília (D. Lucília, Sr. Tarcísio, Tatá e Wandinho), que sempre me acolheu, me fazendo sentir como se eu estivesse em minha própria casa nos momentos de convívio.

Às Tias Matilde e Marly, por estarem sempre demonstrando interesse em saber como o trabalho estava indo e pelas boas conversas que nós tivemos.

Ao Aloísio, de cujos incentivos eu nunca me esqueci.

Ao Prof. Dr. Elio Hideo Babá, por ser, antes de tudo, uma excelente pessoa, e por ter disponibilizado, sem ressalvas, o Laboratório de Bioquímica, contribuindo muito para o nosso trabalho.

Ao amigo doutorando Eduardo Antônio Ferraz Coelho, da UFMG, pela constante disponibilidade em ajudar e esclarecer dúvidas.

Ao Prof. Dr. George Luís Lins Machado Coelho, pelos providenciais auxílios nas análises estatísticas.

Ao Roney, ao Lauro e ao Sr. Claudino, que confiaram em mim e que, até hoje, considero como meus professores e dedico meu maior respeito.

Aos meus amigos muito especiais: Cássio, Daniel e Márcia, a quem eu devo grande parte desse trabalho por ter deles recebido ajuda gratuita em todos os momentos que precisei.

RESUMO

A leishmaniose visceral americana no Brasil é uma zoonose inicialmente restrita a áreas rurais e peri-urbanas. Com a emergência de novos focos em áreas urbanas, essa doença passou a ter influências significativas na saúde pública, e a vacinação é um importante mecanismo de proteção. Vários protocolos de vacinação vêm sendo testados para as diferentes formas de leishmaniose, e o uso de vacinas de DNA é uma alternativa interessante devido à sua capacidade de indução de imunidade celular prolongada. Além disso, essas vacinas estimulam respostas humorais, auxiliares e citotóxicas, sendo as duas últimas muito importantes para a indução de uma resposta protetora em modelos murinos de leishmaniose visceral.

A LACK (homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada) é uma proteína de 36 kDa altamente conservada entre as diferentes espécies e formas evolutivas de *Leishmania*, e induz proteção contra infecção cutânea por *L. major* por intermédio do redirecionamento da resposta patogênica (Th2) para a protetora (Th1), quando administrada como a versão reduzida de 24 kDa. Sua eficácia como antígeno em vacinações contra *L. chagasi* ainda não foi avaliada. Nós testamos, então, uma vacina de DNA que codifica o gen p36(LACK) (DNA p36(LACK)), administrada pela via intramuscular ou subcutânea, objetivando avaliar seu potencial imunogênico e protetor e sua capacidade de indução de resposta imune prolongada contra *L. chagasi*. Nossos resultados demonstraram que a vacinação com DNA p36(LACK) pela via intramuscular induz uma resposta do tipo 1 (produção de IFN- γ , mas não de IL-4) quando esplenócitos de camundongos vacinados, mas não desafiados, são estimulados com antígenos de *L. chagasi* (50, 100 ou 150 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno solúvel ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno particulado) ou proteína p36(LACK) recombinante (5 $\mu\text{g/mL}$). Não houve produção de TNF ou de óxido nítrico por esses esplenócitos. O mesmo não foi observado quando se utilizou a via subcutânea de imunização, onde não se detectou produção de nenhuma das citocinas ou de óxido nítrico pelos esplenócitos submetidos aos mesmos estímulos. A produção significativa de IFN- γ por esplenócitos estimulados de camundongos vacinados pela via

intramuscular e submetidos a desafio endovenoso com promastigotas de *L. chagasi* 4 ou 12 semanas após a dose de reforço demonstrou a capacidade da vacina de garantir resposta imune prolongada. Entretanto, não houve diminuição de carga parasitária hepática ou esplênica de camundongos vacinados em relação aos controles, demonstrando que a resposta imune induzida pela vacina foi insuficiente para proteger esses camundongos contra o desafio sistêmico, considerando-se quaisquer das vias de vacinação utilizadas.

Portanto, a vacina de DNA p36(LACK) administrada pela via intramuscular se mostrou imunogênica e capaz de induzir resposta imune do tipo 1 prolongada, mas não foi capaz de induzir proteção contra desafio sistêmico por *L. chagasi*.

ABSTRACT

American visceral leishmaniasis in Brazil is a zoonanthroponosis formerly restricted to rural and peri-urban areas. With the emergence of new foci in urban areas, this disease has assumed an important role in public health, and vaccination is an important mechanism of protection. Several vaccination protocols have been tested for the different forms of leishmaniasis, and the use of DNA vaccines is an interesting approach due to its capability to induce a long-term cellular immunity. Furthermore, these vaccines stimulate humoral, helper and cytotoxic responses, the last two being very important to induce a protective response in murine models of visceral leishmaniasis.

LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) is a 36 kDa protein highly conserved between different life cycle stages and species of *Leishmania*, and it was previously shown to protect against cutaneous infection by *L. major*, by redirecting pathogenic Th2 to protective Th1 response when administered as a 24 kDa truncated version. Its efficacy as antigen in vaccination against *L. chagasi* has not been established. Thus, we tested a DNA vaccine that encodes the p36(LACK) gene (p36 (LACK) DNA), administered by intramuscular or subcutaneous route, to evaluate its immunogenicity and induction of protection and long-term immune response against *L. chagasi*. Our results demonstrated that vaccination with p36(LACK) DNA by intramuscular route induces a type 1 response (IFN- γ , but not IL-4, production) when spleen cells of vaccinated, but unchallenged, mice were stimulated with *L. chagasi* antigens (50, 100 or 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of soluble antigen or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of freeze-thawed antigen) or recombinant p36(LACK) protein (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No TNF or nitric oxide was produced by these spleen cells. This wasn't observed when subcutaneous immunization route was tested, where no cytokine or nitric oxide production by spleen cells submitted to the same stimuli was detected. The significant IFN- γ production by stimulated spleen cells of intramuscularly vaccinated mice that were submitted to endovenous challenge with *L. chagasi* promastigotes 4 or 12 weeks after booster demonstrated the vaccine capability to warrant long-term immune response. However, the parasite load in liver or spleen of vaccinated compared to non-vaccinated

mice did not decrease, giving evidences of vaccine incapability to protect these mice against systemic challenge, by using either intramuscular or subcutaneous vaccination routes.

Thus, intramuscular vaccination with p36(LACK) DNA was immunogenic and capable to induce long-term type 1 immune response, but it was not capable to warrant protection against systemic *L. chagasi* challenge.

ÍNDICE

Dedicatória.....	III
Agradecimentos.....	IV
Agradecimentos especiais	IV
Resumo.....	VI
Abstract	VIII
Lista de Figuras	XII
Lista de Siglas	XIII
Introdução	17
Leishmanioses: definição e taxonomia	17
Epidemiologia das leishmanioses	17
Formas clínicas das leishmanioses.....	19
Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	21
Relação com as células do hospedeiro.....	23
Resposta imunológica do hospedeiro.....	26
Resposta imune e patogenia na leishmaniose visceral.....	28
Modelos experimentais	30
Vacinas.....	31
Tipos de vacinas.....	32
Vacinas de DNA: características gerais.....	34
Mecanismos e agentes potencializadores das vacinas de DNA	35
Métodos de vacinação.....	36
Como funcionam as vacinas de DNA.....	36
Aplicações das vacinas genéticas contra as leishmanioses.....	37
Vacinas de DNA e LACK.....	39
LACK em humanos.....	41
Vacinas de DNA e leishmaniose visceral no Brasil.....	42
Objetivos	44
Objetivo Geral.....	44
Objetivos Específicos.....	44
Delineamento Experimental.....	46
Material e Métodos	48
Animal experimental, parasita e antígeno.....	48
Quantificação de parasitas.....	50
Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas e óxido nítrico	50
Dosagens de IFN- γ , IL-4, TNF e óxido nítrico	51
Experimentos de imunização	54
Plasmídeos.....	55
Cultura de bactérias, extração e purificação dos plasmídeos.....	56
Preparo do DNA para vacinação.....	58
Análise estatística.....	60

Resultados	63
Elektroforese em gel de agarose dos DNAs extraídos e purificados	63
Curva de crescimento de <i>L. chagasi</i> M2682.....	64
Determinação da curva de carga parasitária no baço e no fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. chagasi</i>	65
Verificação do padrão de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e óxido nítrico em 2, 4 e 6 semanas de infecção.....	67
Verificação da capacidade de indução de resposta imunológica pela vacina de DNA p36(LACK)	71
Avaliação da carga parasitária no baço e no fígado de camundongos após vacinação com DNA pCI-neo-p36(LACK)	77
Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos vacinados e desafiados com <i>L. chagasi</i> 4 ou 12 semanas após dose de reforço	80
Sumário	85
Discussão.....	88
Conclusões	101
Referências Bibliográficas	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítios de vacinação intramuscular e sub-cutânea em camundongo BALB/c.....	54
Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pCI-neo.....	56
Figura 3. Curva padrão para quantificação de DNA.....	59
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos plasmídeos utilizados para a vacinação.....	63
Figura 5. Curva de crescimento de <i>L. chagasi</i> M2682 em DMEM 20% SFB, pH 6,8.....	64
Figura 6. Curso de infecção por <i>L. chagasi</i> em camundongos BALB/c.....	66
Figura 7. Produção de IFN- γ em 2, 4 e 6 semanas de infecção.....	68
Figura 8. Produção de IL-4 em 2, 4 e 6 semanas de infecção.....	70
Figura 9. Produção de IFN- γ produzido por esplenócitos após vacinação subcutânea com pCI-neo-p36(LACK).....	72
Figura 10. Produção de IL-4 produzido por esplenócitos após vacinação subcutânea com pCI-neo-p36(LACK).....	73
Figura 11. Produção de IFN- γ por esplenócitos após vacinação intramuscular com pCI-neo-p36(LACK).....	75
Figura 12. Produção de IL-4 por esplenócitos após vacinação intramuscular com pCI-neo-p36(LACK).....	76
Figura 13. Carga parasitária no baço de camundongos BALB/c vacinados e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço.....	78
Figura 14. Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c vacinados e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço.....	79
Figura 15. Produção de IFN- γ por esplenócitos após vacinação subcutânea ou intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafio com <i>L. chagasi</i>	81
Figura 16. Produção de IL-4 por esplenócitos após vacinação subcutânea ou intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafio com <i>L. chagasi</i>	83

LISTA DE SIGLAS

- ABTS: Ácido 2,2' - bis - azino (3 - etilbenzil - thiazol - 6 - sulfônico)
- Ag Lc: Antígeno Particulado de *Leishmania chagasi*
- AIDS: Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida
- AP-1: Proteína 1 de Ativação
- BCG: Bacilo de Calmette e Guérin
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- CMV: Citomegalovírus
- CPb: Cisteína Proteinase b
- CpG ODN: Citosina-fosfato-Guanosina Oligodeoxinucleotídeo
- D.O.: Densidade Ótica
- DMEM: Meio Essencial Mínimo Dulbecco
- ERK: Quinase Regulada por Sinais Extracelulares
- FIA: Adjuvante Incompleto de Freund
- FML: Ligante de Fucose-Manose
- gp: glicoproteína
- HASPB₁: Proteína B₁
- HBsAg: Antígeno Austrália
- IFN: Interferon
- IL: Interleucina
- IL-12R: Receptor de IL-12
- IL-4R α : Cadeia Alfa do Receptor de Interleucina-4
- iNOS: Óxido Nítrico Sintase indutível
- IRF: Fator Regulatório do Interferon
- Jak/STAT: Janus quinase/Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição
- LACK: Homólogo de *Leishmania* de Receptores de Proteína Quinase C Ativada
- LCF: Fator Quimiotático de *Leishmania*
- LPG: Lipofosfoglicano

LVA: Leishmaniose Visceral Antroponótica
LVZ: Leishmaniose Visceral Zoonótica
MAC: Complexo de Ataque à Membrana
MCP: Proteína Quimiotática para Monócitos
MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal
MPL: Monofosforil Lipídio A
mRNA: Ácido Ribonucléico mensageiro
MTT: “3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2] - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide”
NF-κB: Fator Nuclear κB
NK: “Natural Killer”
p24 (LACK): Versão Reduzida de 24 kDa da Proteína LACK
p36 (LACK): Proteína LACK de 36 kDa
PBS: Salina Tamponada com Fosfato
pCI-neo-p36(LACK): pCI-neo com inserto do gen p36(LACK)
PKC: Proteína Quinase C
PPG: Proteofosfoglicano
RACK: Receptor de Proteína Quinase C Ativada
rIFN: Interferon recombinante
rIL-4: Interleucina-4 recombinante
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte
rRNA: Ácido Ribonucléico ribossômico
rTNF: Fator de Necrose Tumoral recombinante
rVVp36(LACK): vírus Vaccinia recombinante com inserto do gen p36(LACK)
SDS: Lauril Sulfato de Sódio
SFB: Soro Fetal Bovino
SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear
SLA: Antígeno Solúvel de *Leishmania*
ssDNA: Ácido Desoxirribonucleico de fita única
TAE: Tris Acetato EDTA

TCR: Receptor de Célula T

TE: Tris EDTA

TGF: Fator de Crescimento Tumoral

Th: T “helper”

TLR: Receptor Tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VVp36IL-12: vírus Vaccinia com inserto dos genes p36(LACK) e IL-12

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses: definição e taxonomia

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que agrupa espécies de parasitos unicelulares, digenéticos (heteroxenos), encontrados nas formas flageladas promastigotas e paramastigotas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e amastigota, sem flagelo livre, parasito intracelular obrigatório do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados. Sua posição taxonômica inclui a ordem *Kinetoplastida*, sub-ordem *Trypanosomatina* e família *Trypanosomatidae* (Lainson & Shaw, 1992). Por volta de 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos já estão descritas, e estas estão divididas, de acordo com estudos de isoenzimas e análise de RNA ribossômico (rRNA), em duas seções: Seção Euleishmania, que compreende espécies dos sub-gêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e Seção Paraleishmania, que compreende várias espécies de *Leishmania* cuja classificação ainda está incerta, incluindo *L. herreri*, *L. equatoriensis*, *L. deanei*, *L. hertigi* e *L. colombiensis* (Cupolillo e cols., 2000). As espécies do sub-gênero *L. (Leishmania)* – encontradas no Novo e no Velho Mundo - caracterizam-se por se desenvolverem na porção média e anterior do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, enquanto que as do sub-gênero *L. (Viannia)* – encontradas no Novo Mundo - se desenvolvem no intestino anterior e posterior do mesmo (Lainson & Shaw, 1987; Ryan e cols., 1987).

Epidemiologia das leishmanioses

Os principais reservatórios de *Leishmania* spp no mundo são: a preguiça (*Choloepus* spp e *Bradypus* spp), o cão doméstico (*Canis familiaris*), o hyrax (*Procavia* spp e *Heterohyrax brucei*), ratos (*Ototylomys phyllotis*, *Neotoma micropus* e *Psammomys obesus*, *Proechimys* spp), o gerbil ou “esquilo da Mongólia” (*Rhombomys opimus*) e a paca (*Cuniculus paca*), dentre outros (Ashford, 1996). Os canídeos são os reservatórios mais

comumente descritos para as espécies viscerotrópicas na região Mediterrânea, Ásia, norte da África e América do Sul. Dois tipos básicos de ciclos epidemiológicos são observados, dependendo da presença ou ausência de reservatórios: zoonose ou antroponose. A Leishmaniose Visceral Antroponótica (LVA) humana associa-se usualmente à *L. donovani* no Velho Mundo (Maurício e cols., 1999) e a Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ), na qual os cães são reservatórios, está associada à *L. infantum* na Ásia e em países mediterrâneos e à *L. chagasi* no Novo Mundo (Maurício e cols., 1999; Maurício e cols., 2000).

As Leishmanioses prevalecem em quatro continentes (América, África, Europa e Ásia) e são consideradas endêmicas em 88 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento. Verifica-se que 90% de todos os casos de Leishmaniose Cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, 90% dos casos mundiais de Leishmaniose Mucocutânea ocorrem no Brasil, Peru e Bolívia e a mesma porcentagem de casos de Leishmaniose Visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2001). No Brasil, a LVZ surge pela introdução do agente etiológico (*L. chagasi*) no ciclo doméstico quando raposas (*Dusycion vetulus*) infectadas invadem o peri-domicílio para se alimentarem das criações e são picadas por insetos transmissores (*Lutzomyia longipalpis*) peri-domiciliares, que passam a ser potenciais transmissores para cães e homens (Deane & Deane, 1962; Lainson e cols., 1969). No estado de Minas Gerais, a ocorrência crescente de transmissão de Leishmaniose na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Oliveira e cols., 2001), onde a população rural é inexpressiva, leva à caracterização dessa patologia como doença urbana. Entre 1994 e 1999, dos 36 municípios da RMBH, 89% apresentaram notificações de Leishmaniose Tegumentar Americana. Houve também um aumento de 17% para 42% no número de municípios notificados para casos de Leishmaniose Visceral nos biênios 94/95 e 98/99, respectivamente, o que mostra sua rápida e extensa expansão nessa região (Profeta da Luz e cols., 2001). Das notificações relativas à ocorrência de Leishmaniose Visceral na RMBH entre 1994 e 1999, 28,9% são de crianças de 0 a 4 anos de idade e 4,9% de crianças abaixo de 1 ano de idade o que, de

acordo com observações feitas em outras áreas endêmicas no Brasil, reflete sua ocorrência no peri ou intra-domicílio (Silva e cols., 2001).

As Leishmanioses - principalmente a forma visceral, por ser a mais grave - são sérios problemas de saúde pública decorrentes de mudanças de comportamento humano em relação ao meio ambiente. A forma visceral ocorre também em outros países da América do Sul, como Venezuela (Aguilar e cols., 1998; Delgado e cols., 1998) e Colômbia (Travi e cols., 1998) e em vários centros urbanos brasileiros, como São Luís-MA (Nascimento e cols., 1996; Caldas e cols., 2001), Teresina-PI (Werneck e cols., 2003) e Salvador-BA (Cunha e cols., 1995). O nordeste brasileiro é a região onde ocorre a maior parte dos casos de Leishmaniose Visceral do país (92%), acompanhada da região sudeste (4%), norte (3%) e centro oeste (1%) (Fundação Nacional de Saúde, 2000). Esses casos notificados em sua maioria no nordeste brasileiro e em cidades importantes do norte de Minas Gerais, como Montes Claros (França-Silva e cols., 2003), demonstram o caráter de urbanização das Leishmanioses em geral e sua associação com precárias condições econômicas e sociais das comunidades afetadas (Vieira & Coelho, 1998; Santos e cols., 2000).

Formas clínicas das leishmanioses

As Leishmanioses podem ser divididas em dois tipos, de acordo com os órgãos que acometem: Leishmaniose Tegumentar (Leishmaniose Tegumentar Americana, no Novo Mundo e Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo), que acomete a pele e mucosas, e a Leishmaniose Visceral, que acomete as vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea. As formas clínicas encontradas em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana podem ser agrupadas em três tipos básicos: **Leishmaniose Cutânea:** caracterizada inicialmente pela formação de um nódulo no local da picada, devido principalmente à migração de leucócitos, o que leva a um processo de necrose tecidual resultando na formação de uma úlcera seca, que pode variar de poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro. Pode haver, também, infartamento dos linfonodos drenantes e ocorrência de úlceras múltiplas (Ashford, 2000). Essa forma é causada por espécies dos

Complexos *mexicana* e *braziliensis* nas Américas Central e do Sul. No Brasil, as espécies que parasitam o homem são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) lainsoni* (Raso & Genaro, 1994); **Leishmaniose Mucocutânea:** caracterizada pelo surgimento, meses ou anos após a lesão primária, de lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens (Ashford, 2000). O agente etiológico é, normalmente, a *L. (V.) braziliensis* (Grimaldi & Tesh, 1993) e **Leishmaniose Cutânea Difusa:** caracterizada pela formação de lesões difusas não ulceradas na pele, nas quais se encontra grande número de formas amastigotas. Está estreitamente associada a pacientes anérgicos, cuja resposta imunológica celular a antígenos de *Leishmania* está prejudicada (Ashford, 2000). É causada por *L. (L.) pifanoi*, na Venezuela e *L. (L.) amazonensis*, no Brasil (Convit e cols., 1972).

A Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo é causada por três agentes distintos pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, causadoras de Leishmaniose Cutânea antroponótica (urbana) e zoonótica (rural), respectivamente (Handman, 2001) e *L.(L.) aethiopica*, que causa Leishmaniose Cutânea ou Cutânea Difusa (Convit e cols., 1972).

A Leishmaniose Visceral é uma enfermidade crônica, caracterizada pela presença de febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, debilidade progressiva e caquexia e pode, em indivíduos não tratados adequadamente ou com deficiência imunológica, levar ao óbito (Ashford, 2000). Ela é também conhecida como Calazar ou Leishmaniose Visceral Americana, no Brasil. É causada por *L. (L.) chagasi*, no Novo Mundo e por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, no Velho Mundo, todas pertencentes ao Complexo *Leishmania donovani* (Lainson & Shaw, 1987). Suas manifestações clínicas estão relacionadas com o equilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do SFM, a resposta imunológica do indivíduo e as alterações degenerativas resultantes desse processo. O Calazar pode ser classificado, com relação às formas clínicas, da seguinte maneira: **Forma Assintomática:** caracterizada pela ausência de sintomatologia. Os testes sorológicos apresentam positividade com presença de parasitos nos tecidos e intradermorreação de Montenegro positiva; **Forma Aguda:**

caracterizada por febre hepatoesplenomegalia, leucopenia, anemia com detecção de parasitos em cultura ou em exame direto de aspirado de medula óssea, normalmente com sorologia negativa nos meses iniciais. Normalmente tende a uma rápida progressão para o Calazar clássico; **Forma sub-clínica:** caracterizada por exame clínico normal, sorologia positiva, sem detecção de parasitos em cultura ou em exame direto de aspirado de medula óssea, pequena hepatomegalia sem esplenomegalia, linfadenopatia, podendo progredir para o Calazar, com o desenvolvimento de febre alta e positividade para exames de aspirado de medula óssea (Badaró e cols., 1986b; Fundação Nacional de Saúde, 2000), e **Forma Clássica:** caracterizada pela ocorrência de vários sintomas, dentre eles: febre, astenia, fenômenos hemorrágicos, retardo de puberdade, amenorréia, queda de cabelos e alterações nos exames laboratoriais, tais como: pancitopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Badaró e cols., 1986^a; Fundação Nacional de Saúde, 2000).

Ciclo biológico da *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* se apresentam sob três diferentes formas: **Formas amastigotas**, que são formas ovóides ou esféricas, com um único núcleo esférico ou ovóide, cinetoplasto em forma de bastão e sem flagelo livre; **Formas promastigotas**, que são formas alongadas flageladas, com núcleo central e semelhante ao das formas amastigotas e cinetoplasto ovóide posicionado na região anterior e **Formas paramastigotas**, que se apresentam ovais ou arredondadas, com flagelo livre e cinetoplasto próximo ao núcleo ou posterior a ele. Estas formas se encontram aderidas ao epitélio do trato digestivo do inseto vetor pelo flagelo através de hemidesmossomas.

Os insetos vetores das leishmanioses são flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, exemplificados pelo *P. (Phlebotomus) papatasi* no Velho Mundo (Ready, 2000; Rogers & Titus, 2003) e *Lutzomyia*, exemplificado pela *Lu. longipalpis*, principal vetor de *L. chagasi* no Novo Mundo (Ferro, 1995; Rogers & Titus, 2003) e pela *Lu. intermedia* (da Silva & Gomes, 1999).

O ciclo biológico da *Leishmania* se inicia quando a fêmea do inseto vetor pica o animal vertebrado infectado e, durante o repasto, adquire formas amastigotas que parasitam principalmente macrófagos presentes no sangue ingerido. Entre 15 a 221 horas após a picada, as formas de *Leishmania* já estão presentes no intestino médio do inseto (Lainson & Shaw, 1988). No lúmen intestinal, ocorre rompimento do macrófago, liberando as formas amastigotas que sofrem divisão binária e se transformam em promastigotas, que se dividem rapidamente, colonizando o trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. Após isso, elas se transformam em paramastigotas que se aderem pelo flagelo aos epitélios do esôfago e da faringe através de hemidesmossomas. Estas formas se transformam novamente em promastigotas. No intestino médio do inseto ocorrem duas linhas de desenvolvimento parasitário: numa delas ocorre a transformação de amastigotas pequenas e não proliferativas diretamente em promastigotas muito pequenas, conhecidas como infectivas ou metacíclicas, que são responsáveis, como o próprio nome já diz, pela infectividade do parasito. Na outra, formas amastigotas maiores e altamente vacuolizadas sofrem pelo menos duas divisões, dando origem a promastigotas maiores, alongadas, não proliferativas e não infectivas (Lainson & Shaw, 1988). Durante novo repasto, as formas promastigotas presentes no trato digestivo anterior, probóscida, faringe e esôfago são transmitidas pelo flebotomíneo a um hospedeiro não infectado. Isso se dá, possivelmente, pela regurgitação causada pelo bloqueio da válvula proventricular, gerado pelo intenso parasitismo do intestino anterior. Estas formas são, então, fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. A partir daí, ocorre nova transformação das formas promastigotas em amastigotas no interior dos macrófagos. Essas formas sofrem várias divisões binárias no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos que, densamente parasitados, se rompem ou realizam exocitose (Rittig & Bogdan, 2000), liberando as amastigotas que podem, assim, parasitar novos macrófagos e serem repassadas a outro flebotomíneo durante nova picada.

Relação com as células do hospedeiro

As formas flageladas promastigotas se aderem aleatoriamente aos fagócitos mononucleares dos mamíferos, que iniciam seu englobamento através da emissão de pseudópodes (Rittig & Bogdan, 2000). Substâncias vasodilatadoras e com efeitos imunomodulatórios e anticoagulantes presentes na saliva dos insetos transmissores levam ao aumento de quimiotaxia de macrófagos, que resulta no aumento da fagocitose, inibem apresentação de antígeno para linfócitos T, inibem produção de citocinas tipo 1, reduzem ativação celular causada pela ação de Interferon gama (IFN- γ) e regulam negativamente a produção de óxido nítrico, que é um dos responsáveis pela morte da *Leishmania* (Zer e cols., 2001). Uma dessas substâncias é o Maxadilan, peptídeo presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis*, que tem grande importância na promoção do estabelecimento da infecção e pode ter importantes implicações no desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose (Castro-Sousa e cols., 2001; Rogers & Titus, 2003).

Antes da entrada nas células do hospedeiro, as formas promastigotas podem utilizar mecanismos de defesa do organismo, como as proteínas do Sistema Complemento, para se evadirem das respostas imunológicas. Essas formas lançam mão do poder de opsonização dessas proteínas para facilitar sua penetração nos fagócitos mononucleares e monócitos através da ligação com receptores de Complemento presentes na superfície dessas células. Essa penetração de *Leishmania* opsonizada ocorre sem que haja ativação da explosão oxidativa (Handman & Bullen, 2002). No interior dos fagolisossomos dessas células, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam e se disseminam, atingindo outros monócitos do sangue periférico, sendo levadas até órgãos e tecidos, como fígado, baço e medula óssea (Dominguez e cols., 2003). Substâncias glicolípídicas como o Lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície celular de formas promastigotas de *Leishmania* têm atividade inibitória sobre a ação de monócitos por bloquearem sua adesão endotelial e migração transendotelial através da alteração de expressão de moléculas de adesão juncional e modulação de proteínas juncionais intercelulares e de síntese de Proteína Quimiotática para Monócitos (MCP-1) (Lo e cols., 1998). Além disso, LPG e a

glicoproteína de superfície de 63 kDa (gp63) - uma metaloprotease de zinco abundante na superfície de promastigotas - também se ligam a receptores de Complemento, facilitando a fagocitose. A mesma função exercem as moléculas de Proteofosfoglicanos (PPG) na superfície de amastigotas (Handman & Bullen, 2002). Essa opsonização de promastigotas pode também aumentar a sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos (Brittingham & Mosser, 1996). O LPG também garante resistência das formas promastigotas à lise pelo Complemento humano (pelo impedimento da ligação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) à superfície celular) e à ação de agentes oxidantes. Fosfoglicanos liberados pelas promastigotas no meio inibem a formação do fagolisossomo durante a invasão, até que a forma promastigota se diferencie em amastigota (Späth e cols., 2003).

Infecções crônicas por *L. donovani* levam a uma falha na migração de células dendríticas da zona marginal para a região periarteriolar do baço, associada a uma perda de expressão de receptores CCR7 de quimiocinas CCL21 e CCL19 (Ato e cols., 2002). Formas promastigotas de *L. major* induzem atividade quimiotática para neutrófilos e monócitos através da indução de expressão de quimiocinas, o que favorece a infecção (Badolato e cols., 1996). Além disso, a *Leishmania* produz o Fator Quimiotático de *Leishmania* (LCF) que age sobre granulócitos neutrófilos, mas não em monócitos ou células “Natural Killer” (NK), causando um influxo dessas células para o sítio de infecção (van Zandbergen e cols., 2002). *Leishmania major* é capaz de inibir a apoptose espontânea dos neutrófilos, prolongando sua vida ao mesmo tempo em que o parasito se protege da ação anti-microbiana dos macrófagos durante sua estadia no interior dos granulócitos (hipótese do cavalo de Tróia) (Aga e cols., 2002).

Na infecção por *Leishmania*, o pH do interior do vacúolo parasitóforo se mantém ácido, o meio continua rico em proteínas microbidas e enzimas hidrolíticas e o tráfego vesicular não parece ser perturbado. Entretanto, ocorre inibição de produção de radicais de oxigênio e água oxigenada no vacúolo. Há diferenças, com significado ainda a se estabelecer, entre os vacúolos parasitóforos formados em infecções por diferentes espécies de *Leishmania*: *L. mexicana* e *L. amazonensis* levam à formação de vacúolos maiores, com

várias amastigotas, enquanto *L. major* e *L. donovani* levam à formação de vacúolos menores com pouco espaço entre as amastigotas (Handman & Bullen, 2002).

Infecção de macrófagos por *L. donovani* bloqueia a transdução de sinal resultante da ação do IFN- γ sobre a via Janus quinase/Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição (Jak/STAT), o que inibe a ativação dessas células (Ray e cols., 2000). Além disso, a infecção por *L. donovani* aumenta os níveis de ceramida intracelular dos macrófagos, levando ao silenciamento de suas respostas antileishmaniais através da defosforilação da Quinase Regulada por Sinais Extracelulares (ERK), o que está associado com a inibição da Proteína 1 de Ativação (AP-1) e do Fator Nuclear κ B (NF- κ B). Isso resulta numa menor produção de óxido nítrico, facilitando a sobrevivência do parasito no interior do macrófago (Ghosh e cols., 2002).

Durante a leishmaniose visceral em humanos ocorre elevação dos níveis de Fas solúvel (possível inibidor de apoptose mediada pela superfamília Fas de receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF) através da neutralização de ligantes de Fas) e ligante de Fas solúvel no plasma. Ao mesmo tempo, a expressão de Fas e ligante de Fas em células mononucleares do sangue periférico se mostra dentro dos limites da normalidade. Isso reflete a característica do sangue de não ser um sítio normal de infecção por *L. donovani*. Por outro lado, em esplenócitos infectados ocorre aumento da expressão de Fas ligado à membrana e de Fas ligante, o que sugere um papel para a apoptose de linfócitos como causa da imunossupressão observada na patogênese da leishmaniose visceral (Eidsmo e cols., 2002).

Infecções por *L. chagasi* inibem produção de moléculas proinflamatórias e têm efeitos modulatórios negativos em macrófagos e monócitos humanos (de Almeida e cols., 2003) e *L. donovani* modula negativamente a expressão de moléculas de Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) classes I e II, prejudicando a apresentação de antígeno (Reiner e cols., 1987).

Resposta imunológica do hospedeiro

A incapacidade de controle da leishmaniose em camundongos está relacionada com a insuficiente produção de IFN- γ pelos linfócitos T e conseqüente falha na ativação de macrófagos para a destruição das formas intracelulares amastigotas.

Em modelos murinos de leishmaniose cutânea causada por *L. major*, linhagens de células protetoras apresentam propriedades T “helper” 1 (Th1) com secreção de citocinas Interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ e linhagens de células exacerbantes apresentam propriedades Th2 e são secretoras de IL-4 e IL-5, com diferentes efeitos no resultado da infecção. O balanço entre esses dois sub-grupos resulta na susceptibilidade ou resistência na leishmaniose experimental (Scott e cols., 1988).

Camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* apresentam uma forte correlação entre susceptibilidade e desenvolvimento de lesões e uma resposta imune tipo Th2. Essa resposta aberrante está correlacionada com a rápida produção de IL-4 por células T CD4⁺ V β 4 V α 8 (Launois e cols., 1997). Essa peculiaridade dos camundongos BALB/c é devida à proliferação desses linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 responsivos à proteína LACK (Homóloga de *Leishmania* de Receptores de Proteína Quinase C Ativada) presente em bactérias da flora intestinal destes camundongos e que também está presente nas diferentes espécies e formas de *Leishmania*. Gera-se, então, uma reação cruzada destes linfócitos de memória com a *Leishmania*, resultando na forte e precoce produção da citocina IL-4 (Julia e cols., 2000; Schilling & Glaichenhaus, 2001). Essa produção precoce de IL-4 é precedida pela rápida expressão de transcritos de RNA mensageiro (mRNA) para IL-4 no baço de camundongos BALB/c 90 minutos após infecção endovenosa com *L. major* e nos linfonodos dos mesmos camundongos 16 horas após infecção subcutânea com os mesmos parasitos (Launois e cols., 1999). Como a susceptibilidade de mamíferos a patógenos intracelulares é determinada durante a transição inicial da imunidade inata para a específica (Fearon & Locksley, 1996), esses camundongos adquirem esse fenótipo característico de susceptibilidade. Por outro lado, IL-4 presente em determinadas concentrações e durante a ativação inicial de células dendríticas pode levar ao fenótipo de

resistência em camundongos susceptíveis por levar à diferenciação dessas células em células dendríticas produtoras de IL-12, citocina importante na diferenciação de linfócitos virgens em linfócitos Th1 (Biedermann e cols., 2001). Por tudo isso, ainda não é suficientemente clara a influência da produção inicial de IL-4 como determinante para a susceptibilidade (Julia & Glaichenhaus, 1999). A citocina IL-10, apesar de não ser mediadora dominante na susceptibilidade de BALB/c à infecção por *L. mexicana* ou *L. amazonensis*, tem papel importante na regulação do desenvolvimento de resposta Th1 protetora e, se neutralizada juntamente com a IL-4, leva a uma resolução efetiva da doença (Padigel e cols., 2003). Sua elevada produção no início da infecção e a inibição da produção de IFN- γ *Leishmania*-específica pode contribuir para que a resposta seja direcionada para o tipo Th2 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* (Chatelain e cols., 1998).

Fatores como a explosão oxidativa e a enzima Óxido Nítrico Sintase indutível (iNOS) são importantes para a eliminação dos parasitos pelos macrófagos em camundongos. Em humanos, o principal mecanismo de eliminação da *Leishmania* pelos macrófagos resulta da ação de radicais de oxigênio, mas também há possibilidade de envolvimento do óxido nítrico (Mossalayi e cols., 1999). A produção de óxido nítrico resultante da ativação de macrófagos em camundongos ocorre após ligação de TNF a receptores específicos ou após outros mecanismos independentes da sinalização através desses receptores, mostrando que o TNF não é essencial para a indução de produção de óxido nítrico (Nashleanas e cols., 1998). Em infecções de camundongos C57BL/6 por *L. major*, IFN- γ , ligantes de Fas e iNOS parecem ter grande influência no completo controle da replicação parasitária, enquanto a contribuição de TNF é mais importante no controle da inflamação no sítio de inoculação do parasito, já que camundongos deficientes em TNF conseguem controlar a carga parasitária (Chakour e cols., 2003).

A citocina IL-12, na forma de heterodímero (IL-12p35 e IL-12p40), tem grande importância no controle de infecções por *L. major* (Mattner e cols., 1997). Ela é principalmente produzida por células dendríticas em infecções por *Leishmania* (Ahuja e cols., 1999) e estimula proliferação de clones de células T CD4⁺ Th1 em outras doenças

infecciosas como lepra e tuberculose (Sieling e cols., 1994). IL-12 também é essencial para a manutenção de número suficiente de células Th1 de memória ou efetoras geradas *in vivo* para mediar proteção prolongada contra *L. major* (Stobie e cols., 2000). A produção de IFN- γ estimulada por IL-12 é diferencialmente regulada por citocinas como IFN- α e IL-18 (Fantuzzi e cols., 2000).

A presença de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ tem papel fundamental no controle da resposta contra a *Leishmania*, podendo levar à persistência do parasito por tempo prolongado associada à resistência à re-infecção, processo denominado Imunidade Concomitante (Belkaid e cols., 2002). Em camundongos susceptíveis, essas células suprimem a resposta Th2 excessiva, enquanto que, em camundongos resistentes, elas controlam a resposta Th1, permitindo a sobrevivência do parasito e a manutenção da memória imunológica (Aseffa e cols., 2002; Belkaid, 2003).

Resposta imune e patogenia na leishmaniose visceral

Na leishmaniose visceral em humanos, a produção local de TNF pode estar relacionada com o desenvolvimento de doença sintomática ou não, onde altos níveis de TNF- α predisõem as manifestações clínicas (Karplus e cols., 2002). Outros fatores, como a desnutrição, idade e imunocomprometimento têm importantes implicações na gravidade da doença (Anstead e cols., 2001; Fernández-Guerrero e cols; 2003). Células T CD8⁺ e células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-5 também são importantes para o controle da infecção por *L. infantum* em humanos (Mary e cols., 1999). Radicais de oxigênio e óxido nítrico contribuem para a morte intracelular de *L. chagasi* em macrófagos humanos e murinos, respectivamente (Gantt e cols., 2001).

Infecções por *L. chagasi* ou *L. donovani* não são letais para camundongos e as diferenças entre as cargas parasitárias no fígado e no baço após a infecção das diferentes linhagens de camundongos é que definem sua susceptibilidade ou resistência. Além disso, a progressão da infecção nesses dois órgãos em camundongos BALB/c é bem diferente, mostrando um surgimento precoce do parasito e resolução espontânea no fígado, e carga

parasitária mínima no baço até o tempo do pico hepático, com crescimento concomitante ao início da resolução no fígado (Wilson & Weinstock, 1996).

O baço, ao lado da medula óssea, torna-se sítio de infecção crônica, e a esplenectomia tem sido usada em humanos para tratamento da doença severa (Engwerda & Kaye, 2003).

Desafios feitos em camundongos susceptíveis com *L. donovani* pela via cutânea, que não levam à visceralização do parasito, mostram resposta celular antígeno-específica no baço e níveis bastante elevados de mRNA para IFN- γ , IL-12 e iNOS nos linfonodos drenantes. Os mesmos camundongos susceptíveis infectados de forma sistêmica (via endovenosa) mostram uma produção inicial de IL-4, aumento marcante de IL-10, expressão mínima de IL-12 e retardada de iNOS e as células do baço mostram baixa responsividade aos antígenos do parasito, resultando em parasitismo esplênico progressivo (Melby e cols., 1998).

Com respeito à evolução da resposta imune celular esplênica relacionada ao controle da infecção, um aumento de Fator de Crescimento Tumoral (TGF- β) produzido por macrófagos da polpa vermelha, associado aos fatores acima mencionados, leva ao estabelecimento da infecção pela supressão da resposta protetora e inibição da ativação de macrófagos. No entanto, IL-10 e TGF- β são incapazes de subverter o recrutamento e ativação de linfócitos T virgens pelas células dendríticas inicialmente encontradas na polpa branca e, com isso, células T passam a ser ativadas na zona marginal, se difundindo mais tarde pelo baço por intermédio da migração dos linfócitos e das células dendríticas da polpa branca para a vermelha, onde residem os macrófagos infectados. Finalmente, o TGF- β balanceia a resposta protetora de citocinas Th1 (principalmente IFN- γ), mantendo um nível de infecção subclínica, sem eliminação total do parasito (Melby e cols., 2001b).

No fígado, a *Leishmania* parasita as células de Kupffer, causando um influxo de granulócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, resultando na formação de granulomas (Wilson & Weinstock, 1996). Muitas células T do granuloma apresentam fenótipo de memória ou de células ativadas em 6 semanas de infecção com *L. chagasi*, o que ocorre em menor nível nas células do baço. Também comparativamente ao baço, em camundongos susceptíveis o

granuloma hepático possui menos células produtoras de IFN- γ , quantidades semelhantes de IL-10, sem produção de IL-4 ou IL-5 durante cultivo “in vitro”. Além disso, IL-10 parece modular a produção de IFN- γ pelos esplenócitos, mas não é a única a modular a produção dessa citocina pelas células do granuloma hepático, já que outros fatores parecem estar envolvidos na supressão da produção de IFN- γ e de IL-4 (Wilson e cols., 1996). Um desses fatores pode ser o TGF- β (fator capaz de inibir a produção de IFN- γ), cuja presença nos granulomas hepáticos de camundongos BALB/c susceptíveis está associada à inibição da resposta Th1 independente de citocinas Th2 e ajuda a explicar as diferenças órgão-específicas características da leishmaniose visceral em camundongos susceptíveis ou não (Wilson e cols., 1998). IL-4 e IL-13, citocinas que sinalizam através da Cadeia γ do Receptor de IL-4 (IL-4R α), têm papel importante como reguladores da imunidade contra *L. donovani*. Camundongos sem o gen para IL-4R α apresentam decréscimo de níveis séricos de IFN- γ , retardo da maturação do granuloma e de sua função efetora e aumento na frequência de células NOS2⁺ produtoras de óxido nítrico, mas a ausência de IL-4 não influencia na frequência dessas células (Stäger e cols., 2003). A diminuição da produção de IFN- γ pode ter sido devida à inibição de proliferação de células T causada pelo excesso de óxido nítrico que deveria ser regulado pela IL-4 (Patton e cols., 2002). Isso sugere a importância de IL-4 e da sinalização através de seu receptor no desenvolvimento de granulomas hepáticos com atividade ótima contra *Leishmania*. Mas, paradoxalmente a isso, os intermediários reativos de nitrogênio são, por sua vez, imprescindíveis para a limitação da replicação parasitária nos granulomas maduros (Murray & Nathan, 1999).

Modelos experimentais

Dificuldades de visceralização por inoculação intradérmica ou subcutânea, que se assemelham mais com a infecção natural, fazem com que a maioria dos trabalhos feitos com leishmaniose visceral utilizem a via endovenosa de desafio com altas doses do parasito. Isso pode explicar, em parte, o fato de que os níveis de proteção encontrados nos estudos de vacina na leishmaniose visceral murina sejam bem menores que os da

leishmaniose cutânea. A utilização da via intradérmica pode ser bastante útil para os estudos de vacinas em modelos murinos de leishmaniose visceral (Ahmed e cols., 2003).

A utilização de modelos murinos é interessante em estudos do início da replicação parasitária seguido de controle imunológico e infecção subclínica, mas estes modelos não mimetizam a doença progressiva observada na leishmaniose visceral ativa em humanos. As características clínico-patológicas de leishmaniose visceral em hamsters, por sua vez, mimetizam a doença ativa em humanos, o que mostra a importância da utilização desses animais nesses estudos. A limitação da utilização de hamsters se resume, principalmente, pela pouca disponibilidade de reagentes imunológicos no mercado e altos custos, embora o hamster seja um bom modelo para o estudo da leishmaniose visceral (Melby e cols., 2001c). Em estudos de desenvolvimento de vacinas, o modelo murino tem a vantagem de gerar resultados mais rápidos se comparados com estudos em cães. Uma alternativa para que se faça uma melhor comparação com uma população alvo geneticamente heterogênea (homem ou cão) é a utilização de modelos não consanguíneos, como os camundongos albinos “Swiss” (Santos e cols., 2003).

Vacinas

A vacinologia é um ramo da biologia que foca principalmente o desenvolvimento de vacinas funcionais que protejam o hospedeiro contra um microorganismo em particular. Essa proteção ocorre pela indução de respostas imunes humoral e/ou celular e pela formação de células de memória (Weiner & Kennedy, 1999). A vacinologia é mais antiga, empírica e freqüentemente idiossincrática, ao contrário da imunologia, que é mais jovem, conceitual, e procura explicar como um notável e complexo sistema reconhece e protege o organismo contra ameaças internas e externas sem cometer suicídio. A partir do conhecimento das respostas imunológicas geradas pelas vacinas, pode-se observar que estas muitas vezes protegem contra agentes infecciosos através da geração de uma imunidade “não natural”, ou seja, de respostas que se diferem daquelas que surgem durante o desenvolvimento de uma imunidade natural a um microorganismo (Casadevall & Pirofski,

2003). As vacinas são uma das maiores descobertas da medicina moderna e muitas tiveram ou têm ações efetivas, como no caso da varíola, poliomielite, tifo, tétano ou as hepatites A e B, dentre outras doenças. Mas existe uma lacuna no seu desenvolvimento, onde várias doenças importantes como a Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida (AIDS), leishmaniose, malária e hepatite C ficam na fila de espera da descoberta de uma vacina efetiva. As razões da existência dessa lacuna são, principalmente, a pouca efetividade dos métodos padrão de imunização e os riscos inaceitáveis quando utilizadas contra certas doenças (Weiner & Kennedy, 1999).

Tipos de vacinas

As vacinas podem se dividir em tradicionais e genéticas. As vacinas tradicionais, por sua vez, se dividem em **vacinas baseadas em patógenos mortos** (vacina contra hepatite A e vacinas injetáveis para pólio), **vacinas feitas com antígenos isolados dos agentes infecciosos** (vacina antiga contra hepatite B), e **vacinas de seres vivos atenuados** (vacinas contra o sarampo, caxumba, rubéola, pólio oral (Sabin) e varíola). Nos dois primeiros tipos, os antígenos obtidos não podem ser interiorizados pelas células-alvo do hospedeiro, levando a uma resposta humoral e não ativando linfócitos T citotóxicos. Elas são inefetivas contra patógenos que necessitam de resposta celular para serem eliminados e, além do mais, a proteção se perde após algum tempo, necessitando de mais doses de reforço. O terceiro tipo normalmente se compõe de vacinas virais. São capazes de penetrar na célula, levando tanto a uma resposta celular quanto humoral e garantindo proteção mais efetiva. Geram imunidade prolongada e são consideradas “vacinas padrão ouro”. As vacinas feitas com parasitos íntegros podem conter moléculas que não estejam envolvidas no requerimento de imunidade protetora, além de poderem incluir contaminantes no processo de manufatura que podem levar a processos alérgicos ou outras reações que lesionem o organismo. Os principais problemas com as vacinas feitas com patógenos vivos são: possibilidade de comprometimento de pessoas com imunidade debilitada (aidéticos, idosos e pacientes submetidos à quimioterapia), que podem adquirir a doença tanto pela

vacina quanto de pessoas recentemente vacinadas, e os riscos de mutação do vírus, o que pode restaurar a virulência (Weiner & Kennedy, 1999).

As vacinas genéticas são estruturalmente diferentes das tradicionais. As vacinas de DNA e, principalmente, as vacinas baseadas em proteínas recombinantes têm a vantagem sobre as tradicionais por serem aparentemente mais seguras, apesar de menos imunogênicas. Por isso, existe a necessidade de obtenção de adjuvantes mais eficazes e seguros (Glück & Metcalfe, 1992) ou de sua utilização em protocolos com reforço por vetores de recombinantes virais ou outras proteínas recombinantes (Berzofsky e cols., 2001). Outras vantagens das vacinas de DNA são: 1- a sua capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas às das proteínas selvagens, o que contrasta com as proteínas feitas *in vitro* em sistemas de expressão recombinante (que podem ter conformações ou modificações pós-traducionais alternativas) ou com proteínas presentes em vacinas obtidas pela inativação química de patógenos (nos quais as proteínas de superfície podem sofrer ligações cruzadas), 2- capacidade de gerar respostas por linfócitos T citotóxicos e auxiliares, 3- capacidade de apresentar antígenos com modificações pós-traducionais nativas, conformação e oligomerização para formação de anticorpos com ótima especificidade, 4- poder de gerar respostas imunes mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única, o que facilita a imunização simultânea contra doenças diversas, 5- vantagens econômicas (tecnologia do DNA recombinante torna mais fácil o “design” e a geração de grandes quantidades da vacina a baixo custo) e 6- de armazenamento (mais estáveis quando submetidas ao estoque). As vantagens econômicas podem permitir seu amplo uso em países mais pobres, como o Brasil (Donnelly e cols., 1997; Weiner & Kennedy, 1999). Algumas considerações relativas à segurança das vacinas de DNA devem ser feitas. Elas incluem as possibilidades de integração ao genoma do hospedeiro (aumentando o risco de malignidade por ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor), de indução de respostas contra as células transfectadas (levando ao estabelecimento de doenças auto-imunes), de indução de tolerância, ao invés de imunidade ou de estímulo da produção de

citocinas que alterem a capacidade do hospedeiro de responder a outras vacinas e resistir à infecção (Gurunathan e cols., 2000a).

Vacinas de DNA: características gerais

O sistema de vacinas de DNA se diferencia dos sistemas de expressão por vetores virais (que necessitam de uma etapa de empacotamento do DNA) por realizar a clonagem do gen desejado em plasmídeos (Gurunathan e cols., 2000b). Os plasmídeos são moléculas diminutas de DNA circular (minicromossomos) presentes em muitas bactérias como elementos genéticos não ligados ao cromossomo principal. Eles se replicam de forma autônoma e conferem resistência a antibióticos específicos (Watson e cols., 1997). Os requerimentos básicos para um vetor plasmidial são: presença de um forte promotor para expressão ótima em células eucariotas - por exemplo, derivado de Citomegalovírus (CMV), uma origem de replicação que permita seu crescimento em bactérias, um gen de resistência a antibiótico bacteriano e incorporação de seqüências de poliadenilação para estabilização de transcritos de mRNA (Gurunathan e cols., 2000b). O plasmídeo pCI-neo é um exemplo de forte vetor utilizado em transfecções (Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Uma característica importante dos plasmídeos é a presença de seqüências nucleotídicas específicas que têm papel crítico na imunogenicidade das vacinas: as seqüências Citosina-fosfato-Guanosina Oligodeoxinucleotídeo (CpG ODN) flanqueadas por regiões compostas de duas purinas em 5' e duas pirimidinas em 3' (Gurunathan e cols., 2000b). Tais seqüências são normalmente não metiladas no plasmídeo, ao contrário das mesmas nas células eucariotas, e são 16 a 20 vezes mais comuns em micróbios se comparados com mamíferos. Elas se ligam ao Receptor Tipo Toll - 9 (TLR-9) presente em macrófagos e células dendríticas (Medzhitov, 2001; Werling & Jungi, 2002), o que permite que elas ajam como importantes adjuvantes nos processos de vacinação que visam o direcionamento de resposta Th2 para Th1, pois elas induzem a produção de citocinas como IFN- γ e IL-12, do isotipo IgG2a e o decréscimo de produção de IL-5, apesar de também induzirem IL-6 (Chu e cols., 1997; Klinman e cols., 1996).

Após imunização com Proteína LACK de 36 kDa (p36(LACK)) e CpG ODN, observa-se a presença de células dendríticas CD11c⁺ produtoras de IL-12 e IFN- γ nos linfonodos drenantes, culminando numa resposta protetora contra *L. major* em camundongos BALB/c (Shah e cols., 2003). CpG ODN usado como adjuvante em vacinações com proteínas recombinantes ou antígeno de *Leishmania* morta por aquecimento pode levar à proteção prolongada contra *L. major* através da indução de respostas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória (Rhee e cols., 2002). A modulação imune obtida pela utilização de CpG ODN também pode garantir segurança, efetividade e manutenção da proteção prolongada observada em vacinas vivas, possibilitando o uso da leishmanização com minimização da patologia gerada por esse processo (Mendez e cols., 2003). Quando associado a outros adjuvantes em experimentos de soroconversão para Antígeno Austrália (HBsAg), como Sais de Alumínio (Alúmen), Monofosforil Lipídio A (MPL) e Adjuvante Incompleto de Freund (FIA), CpG ODN leva a respostas mais fortes, com aumento dos títulos de anticorpos, em alguns casos com danos teciduais mínimos (Weeratna e cols., 2000). Sua utilização veiculado com lipossomos manossilados leva à produção de iNOS, IFN- γ e IL-12 por esplenócitos infectados com *L. donovani*, sugerindo a possibilidade de sua utilização também no tratamento da leishmaniose (Datta e cols., 2003).

Mecanismos e agentes potencializadores das vacinas de DNA

A eficácia da transferência gênica pode ser aumentada utilizando-se tanto técnicas físicas, como a eletroporação e o canhão gênico, quanto acentuadores químicos, como lipídios ou agentes condensadores. Para potencializar ainda mais a ação das vacinas genéticas, outros adjuvantes têm sido testados, como os Fatores Regulatórios do Interferon (IRFs), que promovem grande proteção quando incorporados a vacinas contra um recombinante do vírus da varíola bovina (vírus Vaccinia) (Bramson e cols., 2003) ou à IL-12 (Coelho e cols., 2002; Matsui e cols., 2003; Bermúdez-Humarán e cols., 2003). Aumento na eficiência da vacinação tem sido obtido pelo uso de carreadores heterólogos, exemplificados pelo vírus Vaccinia, por bactérias - como mutantes avirulentos de

Salmonella spp e Bacilo de Calmette e Guérin (BCG) - ou por preparações de vesículas surfactantes de niossomos, que são sistemas formados pela hidratação de substâncias mono ou dialquil surfactantes, geralmente utilizados como veículos de medicamentos (Lezama-Dávila, 1999). Utilizam-se, também, vesículas de lipossomos, que protegem o DNA de nucleases presentes no local de inoculação e o dirigem para as células apresentadoras de antígeno (Gregoriadis e cols., 2002). A utilização de DNA “nu” em solução salina também tem levado a resultados satisfatórios (Fachado e cols, 2003).

Métodos de vacinação

Além da importância da constituição do próprio plasmídeo, a efetividade da vacina de DNA depende do método de vacinação empregado. Isso está relacionado com o tipo de célula que será transfectada, que dependerá do sítio de vacinação utilizado, e da localização celular do antígeno. Vacinações feitas com canhão gênico e antígeno secretado levam à predominância de uma resposta por células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-4, enquanto o mesmo método utilizado com antígeno associado à célula leva a respostas mistas Th1/Th2 (CD8⁺ produtoras de IFN- γ e CD4⁺ produtoras de IL-4). Injeção salina intramuscular com antígeno associado à célula leva a uma resposta do tipo 1 (CD8⁺ e CD4⁺ produtoras de IFN- γ), enquanto que a mesma com antígeno secretado leva a uma resposta do tipo 1 fraca (Oran e cols., 2003).

Como funcionam as vacinas de DNA

As vacinas de DNA possibilitam a indução de respostas humorais e celulares citotóxicas e auxiliares, com formação de células de memória. Isto se dá tanto pela transfecção direta de células apresentadoras de antígenos quanto pela transfecção de células musculares (Weiner & Kennedy, 1999). Os miócitos parecem ser as células predominantemente transfectadas após a vacinação intramuscular (Donnelly e cols., 2000). Eles podem apresentar a proteína associada a moléculas de MHC classe I e, auxiliados pela

ação de citocinas Th1 produzidas por linfócitos primados por células apresentadoras de antígeno transfectadas, podem primar linfócitos citotóxicos. Estes podem se tornar células efectoras ou de memória. Por outro lado, outras células apresentadoras de antígeno locais podem capturar antígenos secretados pelos miócitos e ativar linfócitos T auxiliares que, produzindo citocinas Th2 ativam células B ligadas a outros antígenos secretados através de imunoglobulinas de superfície. Esses linfócitos B podem se transformar em células de memória ou células produtoras de anticorpos (Weiner & Kennedy, 1999).

Além da transfecção direta de células somáticas como miócitos e queratinócitos e de células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas (Corr e cols., 1999), há um terceiro mecanismo pelo qual as vacinas de DNA são processadas e apresentadas *in vivo* para gerar respostas imunes: o chamado “cross priming”, ou apresentação cruzada (Gurunathan e cols., 2000b). Nesse processo, células apresentadoras de antígeno profissionais capturam e apresentam antígenos exógenos associados a moléculas de MHC classe I, permitindo posterior ativação de linfócitos citotóxicos (Schoenberger e cols., 1998). Alguns estímulos, como os interferons α e β produzidos por células em infecções virais, podem ser sinais de ativação específicos para a indução do “cross-priming” (Le Bon e cols., 2003). Os fagossomos dos macrófagos possuem elementos e propriedades necessários para que eles sejam auto-suficientes para a apresentação cruzada de antígenos exógenos, uma função recentemente atribuída à fagocitose mediada pelo retículo endoplasmático (Houde e cols., 2003).

Aplicações das vacinas genéticas contra as leishmanioses

Vacinas genéticas contra vários tipos de doenças virais, bacterianas e outras doenças parasitárias, como a toxoplasmose, têm se mostrado efetivas e são candidatas à utilização no futuro (Hong e cols., 2001; Matsui e cols., 2002; Iqbal e cols., 2002; Fachado e cols., 2002; Huygen, 2003).

Um grande número de vacinas genéticas também têm sido testadas, induzindo proteção contra as diferentes formas de leishmaniose. Vacina plasmidial intramuscular

codificando o antígeno ORFF (proteína presente nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* mas que é expressa preferencialmente em amastigotas de *L. donovani*) resultou em significativa proteção de camundongos BALB/c contra infecção por *L. donovani* (Sukumaran e cols., 2002); vacina com a Proteína B1 (HASP B1) recombinante sem adjuvante controlou a carga parasitária de *L. donovani* no baço, órgão onde os parasitos usualmente persistem e é refratário a um largo espectro de intervenções imunológicas e quimioterápicas (Stäger e cols., 2000); imunizações diretas ou passivas com a proteína A2 mostraram proteção contra infecção por *L. donovani*, associada à produção de IFN- γ , resposta mista Th1/Th2, forte resposta humoral e reduzida internalização de amastigotas nos macrófagos, o que a torna uma forte candidata a vacina contra a leishmaniose visceral (Ghosh e cols., 2001). A proteína A2 também garante proteção quando utilizada contra infecção por *L. amazonensis* (Coelho e cols., 2003); vacinas de DNA codificando as proteínas gp63 e Cisteína Proteinase b (CPb) de *L. mexicana* e GP46 de *L. amazonensis* protegem parcialmente contra infecção por *L. mexicana* (Dumonteil e cols., 2002).

Vacinas de FML (Ligante de Fucose-Manose) utilizadas na terapêutica têm tido potentes efeitos na modulação da infecção murina por *L. donovani*, levando à redução da carga parasitária e de sinais clínicos da doença (Santos e cols., 2003).

Uma vacina utilizando formas promastigotas mortas de cinco diferentes isolados de *Leishmania* vem sendo testada contra a leishmaniose cutânea desde o final da década de 1970 (Mayrink e cols., 1979). Hoje, ela é produzida a partir de formas promastigotas mortas da cepa PH8 de *L. amazonensis* e conhecida pelo nome de Leishvacin. Essa vacina tem apresentado bons resultados tanto na prevenção contra a leishmaniose cutânea (Mayrink e cols., 1979) quanto no tratamento quando associada a agentes quimioterápicos (Toledo e cols., 2001). Apesar de não ser uma vacina genética, existe a possibilidade de sua utilização associada a vacinas de DNA.

Vacinas de DNA e LACK

O fato de muitos indivíduos, principalmente em áreas endêmicas, adquirirem infecções subclínicas, apresentando respostas de linfócitos antígeno-específicos e produção de IFN- γ (Southgate e cols., 1967; Carvalho e cols., 1981; Badaró e cols., 1986), sugere que a vacinação contra a leishmaniose possa ter efeitos profiláticos.

Respostas imunológicas celulares por intermédio de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ e a produção de IFN- γ têm grande importância no controle de infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/c (Murray e cols., 1982; Stern e cols., 1988; Kaye e cols., 1991; Méndez e cols., 2002). Vacinas de DNA codificando a Versão Reduzida de 24 kDa da Proteína LACK (p24(LACK)) são capazes de induzir proliferação de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ contra *L. major*. Esses linfócitos podem ser responsáveis pela regulação da frequência de linfócitos T CD4⁺, e sua ativação pode ter implicações na maior durabilidade da resposta gerada pela vacina de DNA, se comparada com a de vacinações com proteína p24(LACK) mais IL-12 (Gurunathan e cols., 2000c).

O antígeno LACK é de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas devido ao seu papel na imunopatogênese da infecção experimental por *L. major* e vem sendo estudado em imunizações contra *L. donovani* no Velho Mundo (Melby e cols., 2001a). Estudos feitos em bibliotecas de expressão mostraram a existência dessa proteína, um membro citoplasmático de 36 kDa (312 aminoácidos) da família de proteínas com repetições de triptofano-ácido aspártico, presente nos diferentes estágios do ciclo de vida da *Leishmania*, com alto grau de homologia entre as diferentes espécies do parasito (Mougneau e cols., 1995). Ela recebe esse nome devido à sua homologia com os Receptores de Proteína Quinase C Ativada (RACKs) e se localiza próxima ao cinetoplasto no citoplasma celular, provavelmente ligada a complexos multiproteicos (incluindo isoformas de Proteína Quinase C (PKC) citoplasmáticas), mas não a estruturas de membrana (Gonzales-Aseguinolaza e cols., 1999). Membros da família LACK de proteínas estão envolvidos em várias funções fisiológicas da célula eucariota, dentre elas, a apoptose ou a diferenciação de *Trypanosoma* nas formas sanguíneas (Welburn & Murphy, 1998) e a

interação com seqüências de proteínas envolvidas na replicação de DNA e síntese de RNA de *L. infantum* (Gonzales-Aseguinolaza e cols., 1999). Sua versão reduzida de 24 kDa (aminoácidos 143-312) possui um epitopo imunodominante (aminoácidos 156-173) (Launois e cols., 1997) que ativa restritamente linfócitos T CD4⁺ com Receptor de Célula T (TCR) Vβ4, Vα8 produtores de IL-4, que se expandem inicialmente após infecção natural por *L. major* em camundongos BALB/c. A revelação de antígenos imunodominantes expressos no início da infecção pode permitir o desenvolvimento de vacinas, modulando fortemente o efeito da resposta celular (Mougneau e cols., 1995). Teste de expressão da proteína LACK por vetor plasmidial (pCI-neo) em células COS mostra a eficiência de expressão dessa proteína num modelo de vacina de DNA (Ramiro e cols., 2003). A proteína p24 administrada com IL-12 confere proteção contra *L. major* através do redirecionamento do desenvolvimento natural de células Th2 para Th1 com elevação da produção de IFN-γ e diminuição de produção de IL-4 e IgE (Mougneau e cols., 1995). A partir daí, vários protocolos de imunização com a proteína LACK ou com seu gen codificante passaram a ser testados contra diferentes espécies de *Leishmania*: vacinação subcutânea com DNA p24(LACK) levou à proteção contra desafio com *L. major* em camundongos BALB/c de maneira similar à proteção induzida por proteína p24(LACK) mais IL-12 (Gurunathan e cols., 1997); imunização com p36(LACK) de *L. infantum* e reforço com vírus Vaccinia com insertos dos genes p36(LACK) e IL-12 (VVp36IL-12) induziu redução de 52% no tamanho de lesão e duas unidades logarítmicas de redução na carga parasitária de lesões observadas em infecções por *L. major* em camundongos BALB/c (Gonzalo e cols., 2001); o mesmo antígeno de *L. infantum* expresso por plasmídeo e por vaccinia vírus recombinante em vacinação heteróloga protege camundongos BALB/c contra desafio por *L. major*, com redução de 70% no tamanho da lesão e de 1000 vezes na carga parasitária (Gonzalo e cols., 2002); vacinação com DNA p36(LACK) e reforço com vírus Vaccinia recombinante com inserto do gen p36(LACK) (rVV p36(LACK)) protegem cães contra *L. infantum* (Ramiro e cols., 2003); embora a vacina de DNA p36(LACK) administrada pelas vias intradérmica e subcutânea induza forte resposta do tipo 1, com produção de IFN-γ mas não de IL-4, ela

não induz proteção contra desafio cutâneo ou sistêmico por *L. donovani* (Melby e cols., 2001b).

LACK em humanos

Em humanos, indivíduos nunca expostos à *Leishmania* apresentam geração de células T CD45RA⁺ CD8⁺ (virgens) produtoras de IFN- γ e T CD45RA⁻ CD4⁺ (de memória) produtoras de IL-10 específicas contra LACK de *L. guyanensis* (Bourreau e cols., 2002b). IFN- γ - nos estágios iniciais - e IL-10 são produzidos em resposta à LACK (aminoácidos 156 a 173) em indivíduos infectados com *L. guyanensis* (Bourreau e cols., 2002a). Tais observações sugerem a possibilidade de uso de vacinas com LACK em humanos, seja com adjuvante que supere a produção de IL-10, com LACK modificado no epitopo de IL-10 (aminoácidos 156-173) ou com esse epitopo deletado. Células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ em resposta a Antígeno Solúvel de *Leishmania* (SLA) são precedidas por células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ em resposta à proteína LACK em indivíduos expostos à *Leishmania* em floresta endêmica. Isso sugere que a emergência dessas últimas pode ser usada como marcador imunológico de exposição à *Leishmania* em indivíduos que permanecem livres da doença (Bourreau e cols., 2003). A proteína LACK pode, também, ser utilizada no diagnóstico de leishmaniose visceral por intermédio da utilização do anticorpo anti-LACK p19-11, que é um marcador imunohistoquímico altamente sensível e específico. A utilização desse marcador pode facilitar a detecção do parasito em tecidos de biópsia onde a carga parasitária é baixa, reduzindo a porcentagem de casos falso-negativos, como resultado de sua sensibilidade e diminuindo a falso-positividade, como resultado de sua especificidade (Hofman e cols., 2003). Células NK estimuladas por proteína LACK também são fonte de produção de IFN- γ e IL-10 em indivíduos nunca expostos à *Leishmania*, o que mostra a participação da imunidade inata num possível fenótipo protetor contra infecções subseqüentes (Maasho e cols., 2000).

Vacinas de DNA e leishmaniose visceral no Brasil

Portanto, é importante que se busque o desenvolvimento de estudos sobre vacinas contra os diversos tipos de leishmaniose, principalmente a leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*, importante patologia que se agrava em crianças, mal-nutridos e imunocomprometidos e acomete regiões pobres do Brasil e regiões metropolitanas de várias cidades, dentre elas, Belo Horizonte. As vacinas de DNA expressando a proteína LACK necessitam ser testadas no que diz respeito à sua capacidade de indução de resposta imunológica e proteção contra esse tipo de leishmaniose. Elas são uma ferramenta promissora de bons resultados e ainda estão em fase inicial de testes, o que abre um largo espectro de possibilidades de pesquisa nessa área.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar a capacidade de indução de resposta imune direcionada contra *Leishmania chagasi* de uma vacina de DNA com inserto de um gen codificante da proteína p36(LACK) em camundongos susceptíveis BALB/c.

Objetivos específicos

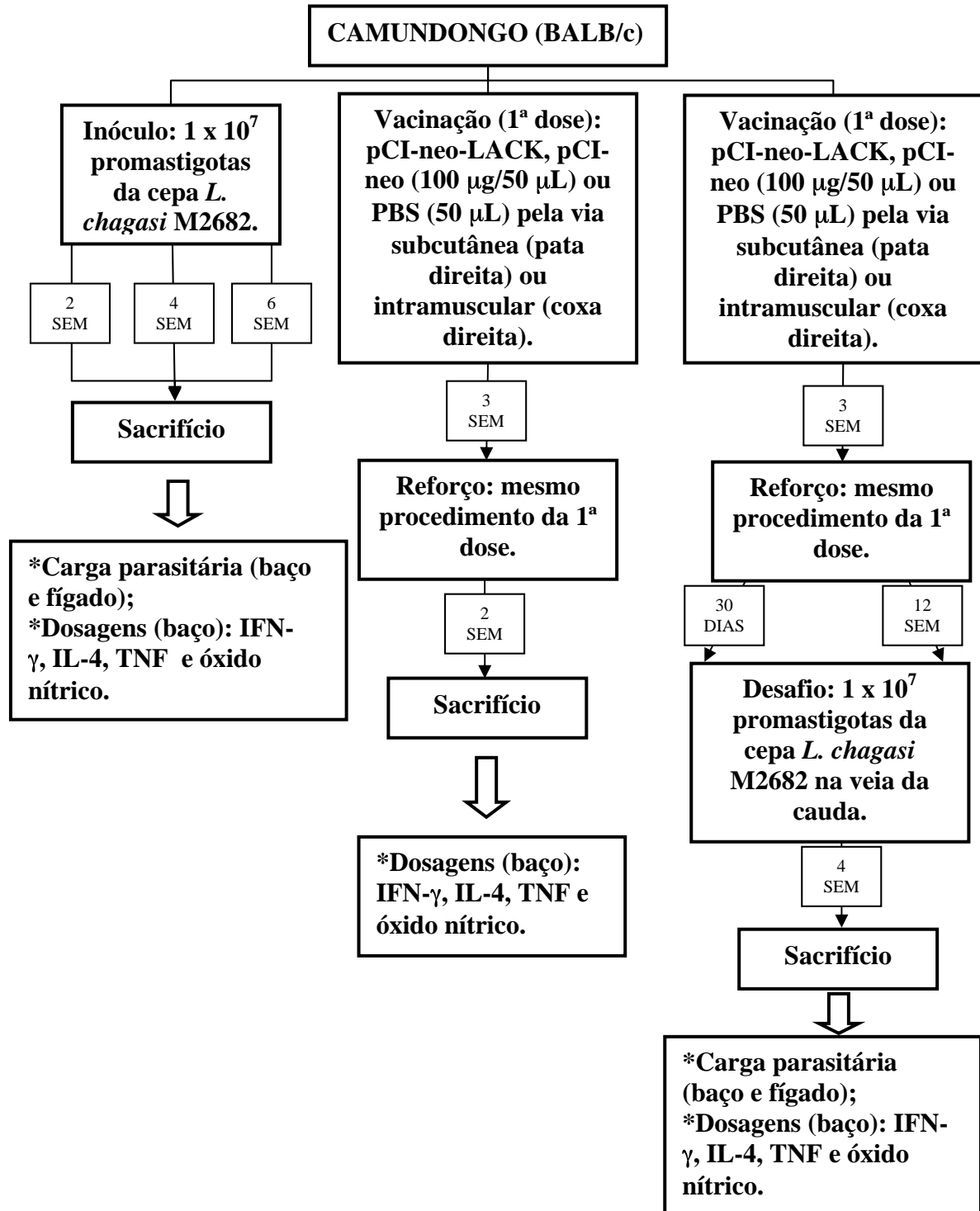
a) Verificar o padrão esplênico de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-4) e de óxido nítrico induzidos pela vacinação após estímulo com antígeno solúvel e particulado de *L. chagasi* e proteína p36(LACK) recombinante em cultura de células mononucleares;

b) Verificar, através da quantificação de parasitas no baço e no fígado, se a vacina é capaz realmente de proteger contra desafio por *L. chagasi* e verificar o padrão esplênico de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-4) e de óxido nítrico produzidos após estímulo com antígeno particulado de *L. chagasi* em cultura de células mononucleares;

c) Verificar se a possível resposta protetora ocorre a longo prazo e verificar o padrão de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-4) e de óxido nítrico produzidas no baço após estímulo com antígeno particulado de *L. chagasi* em cultura de células mononucleares.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental, parasito e antígeno

Para os experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c com idade entre 5 e 8 semanas, adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG. Antes da utilização nos experimentos, os animais foram submetidos, durante 10 dias, ao tratamento com vermífugo Ivermectina (CHEMITEC - São Paulo, SP, BR) a 0,01% em água potável e a 0,1% para borrifamento das gaiolas e mantidos em gaiolas convencionais no biotério da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram utilizados três camundongos por grupo para a determinação das curvas de carga parasitária e para o teste de imunogenicidade e 4 camundongos por grupo para os testes de desafio 4 e 12 semanas após vacinação. Para os experimentos, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania chagasi* isoladas de adulto humano em 1975 no estado da Bahia, Brasil, pelo Prof. Ralph Lainson do Instituto Evandro Chagas - Belém, cepa de referência M2682 (MHOM/BR/1975/M2682). Os parasitos foram cultivados em Meio Essencial Mínimo Dulbecco (DMEM) 20% Soro Fetal Bovino (SFB) (CULTILAB - Campinas, SP, BR), pH 6,8, constituído de DMEM (HYCLONE – Logan, Utah, USA), pH 6,8 (preparado sem bicarbonato de sódio) suplementado com SFB previamente inativado a 56°C/30 min a 20%, L-glutamina (GIBCOBRL – Life Technologies - Grand Island, NY, MO, USA) 2 mM, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina (SCHERING-PLOUGH S/A - Rio de Janeiro, RJ, BR) , 2-mercaptoetanol (PHARMACIA BIOTECH AB - Uppsala, Sweden) 0,05 mM, HEPES (SIGMA – St. Louis, MO, USA) 25 mM, adenina 0,1 mM, hemina 0,25% em trietanolamina 50% a 0,25% e urina humana, previamente centrifugada a 250 x g/4°C/10 min, a 10%. Para os procedimentos de desafio foi utilizada cultura de *Leishmania* em final de fase logarítmica de crescimento, com aproximadamente $6,5 \times 10^7$ *Leishmania*/mL (5 dias de cultura). Os parasitos usados nos experimentos foram mantidos em cultura por, no máximo, 15 repiques para que se evitasse a perda de sua virulência observada após longo tempo de cultura. Periodicamente, as

formas promastigotas foram reisoladas de camundongos. A cultura foi centrifugada a $1540 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$ e lavada por duas vezes em Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,2 esterilizado, nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento final foi ressuspenso em volume de DMEM ou RPMI (SIGMA – St. Louis, MO, USA), pH 7,2 suficiente para a concentração final de 1×10^7 parasitos/dose. Para cada dose foram utilizados 200 μL da preparação, injetados na veia da cauda.

Antígenos do parasito foram também obtidos de cultura de formas promastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Tanto para a obtenção de antígeno particulado quanto para solúvel, a cultura foi centrifugada a $1540 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$ e lavada duas vezes em PBS, pH 7,2 esterilizado, nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de PBS, pH 7,2 esterilizado para a contagem do número total de *Leishmania*. Em seguida, o material foi centrifugado novamente a $1540 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$ e o sedimento foi armazenado a -20°C até o momento do preparo do antígeno. Para obtenção de antígeno particulado, o material armazenado foi submetido a 5 seqüências de resfriamento em nitrogênio líquido (-120°C) e aquecimento a 37°C em banho-maria. Após a lise, os parasitos foram ressuspenso de modo a se obter um lisado com o equivalente a cerca de 5×10^7 parasitos/mL de PBS, pH 7,2 esterilizado e foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry e cols., 1951). Para obtenção de antígeno solúvel, as *Leishmania* previamente lavadas foram submetidas à lise em sonicador (Branson Sonifier® 250 CE Analogue) (5 ciclos de 1 minuto, com intervalos de 30 segundos, 20-30 watts). Após a lise, o material foi centrifugado a $8500 \times g/4^{\circ}\text{C}/30 \text{ min}$ e o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a $100000 \times g/4^{\circ}\text{C}/1 \text{ h } 30 \text{ min}$. O sobrenadante foi coletado, esterilizado por filtração (filtro de seringa 0,2 μm) e as proteínas foram dosadas pelo método de Lowry. Tanto o antígeno particulado quanto o solúvel foram diluídos em PBS, pH 7,2 esterilizado de modo a se obter a concentração final de 1 mg/mL em proteínas. As alíquotas de ambos os antígenos foram armazenadas a -70°C até o uso. As etapas que intercalaram as centrifugações para as duas preparações foram realizadas com material em gelo e, na obtenção de antígeno particulado, sob condições de esterilidade.

Quantificação de parasitos

Baço e fígado foram extraídos e divididos em dois fragmentos que foram pesados. Os fragmentos menores (cerca de 1/5 do tamanho do órgão) foram utilizados para a quantificação de parasitos pela técnica de diluição limitante (Titus, 1985). De acordo com essa técnica, os fragmentos foram macerados em meio DMEM, pH 6,8 (preparado sem bicarbonato de sódio) e a suspensão foi centrifugada a $42 \times g/4^{\circ}\text{C}/1$ min em tubo de fundo cônico de 15 mL. O sobrenadante foi centrifugado a $1540 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min e o sedimento foi ressuspenso em 500 μL de DMEM 20% SFB, pH 6,8 para a distribuição em placa de fundo chato de 96 poços (NALGE NUNC International - Rochester, NY, USA), em duplicata, onde aos primeiros poços foram adicionados 200 μL da suspensão e nos demais poços 160 μL de DMEM 20% SFB, pH 6,8. A partir daí, foram feitas diluições 1:5, transferindo-se 40 μL de poço em poço, até o décimo segundo poço. As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 12 dias. Ao final, foi calculado o número de *Leishmania* por fragmento observando-se o último poço em que havia a presença do parasito: presença até o primeiro poço, até 3 *Leishmania* por fragmento, até o segundo poço, 15, até o terceiro, 75, e assim por diante, sempre num fator múltiplo de 5. O resultado foi expresso como a média dos logaritmos do número de parasitos por órgão total. As etapas que intercalaram as centrifugações foram realizadas com material em gelo e todo o material utilizado foi previamente esterilizado.

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

O fragmento maior de baço foi macerado em meio de lavagem de células, pH 7,2 constituído de DMEM, pH 7,2 com bicarbonato de sódio, suplementado com SFB inativado a $56^{\circ}\text{C}/30$ min a 1%, L-glutamina 2 mM, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de gentamicina e HEPES 25 mM. A suspensão foi centrifugada a $170 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min em tubo cônico de 15 mL, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de solução de lise de

hemácias (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144 mM), pH 7,2, aguardando-se 2 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 8 mL de meio de lavagem ao volume contido no tubo para centrifugação a $170 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de meio de lavagem. As células da suspensão foram diluídas em meio de lavagem, coradas com azul de Tripán a 0,4% em PBS e contadas. Em placa de fundo chato de 48 poços (NALGE NUNC International - Rochester, NY, USA) foram preparados poços com amostra controle ou estímulo (antígeno solúvel, particulado ou proteína p36(LACK) recombinante, gentilmente cedida pela Profa. Dr^a Ana Paula Fernandes, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG), cada poço com $5,0 \times 10^6$ células por mL de DMEM 10% SFB, pH 7,2, constituído de DMEM, pH 7,2 suplementado com SFB inativado a $56^{\circ}\text{C}/30$ min a 10%, L-glutamina 2 mM, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de gentamicina, 2-mercaptoetanol 0,05 mM e HEPES 25 mM. Para isso, o volume correspondente ao número de células desejado ($5,0 \times 10^6/\text{mL}$) foi centrifugado a $170 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado no volume de DMEM 10% SFB, pH 7,2 suficiente para o número de poços desejado. As suspensões foram distribuídas na placa, sem estímulo ou estimuladas com 50, 100 ou 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno solúvel, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno particulado ou 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína p36(LACK), de acordo com o que cada experimento requeria. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C}/5\%$ de CO_2 e os sobrenadantes coletados no dia seguinte e após três dias a partir do preparo, sendo armazenados a -20°C para as dosagens de citocinas e óxido nítrico. As etapas que intercalaram as centrifugações foram realizadas com material em gelo e todo o material utilizado foi previamente esterilizado (Afonso & Scott, 1993).

Dosagens de IFN- γ , IL-4, TNF e óxido nítrico

IFN- γ e IL-4 foram dosados pelo método de ELISA de captura (Scott, 1991; Chatelain e cols., 1992).

Para a dosagem de IFN- γ placas de fundo chato de 96 poços foram cobertas com o anticorpo monoclonal R46A2 (obtido em nosso laboratório), na concentração de 2,5

µg/mL. Para o reconhecimento do IFN-γ ligado ao R46A2 foi utilizado soro policlonal de coelho anti-IFN-γ murino e como conjugado foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (ZYMED LABORATORIES, Inc. - So, San Francisco, CA, USA). Após interrupção da reação com cromóforo Ácido 2,2'-bis-azino (3-etilbenzil-thiazol-6-sulfônico) (ABTS) (SIGMA – St. Louis, MO, USA) e H₂O₂ 30% V/V, foi feita a leitura das placas no leitor Emax Molecular Devices (MOLECULAR DEVICES CORPORATION - Sunnyvale- Califórnia - USA), e os dados foram analisados pelo programa SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 405 nm, e a curva padrão foi submetida à regressão linear. Como padrão, foi utilizado o Interferon gama recombinante (rIFN-γ) murino (R&D Systems Inc. - Mineapolis, MN, USA) na concentração inicial de 1 ng/mL. O limite mínimo de detecção foi de 0,0156 ng/mL.

Para a dosagem de IL-4 foi utilizado o anticorpo de cobertura 11B11 a 5 µg/mL e o BVD-6 biotilado (1:3000) para a detecção, ambos produzidos em nosso laboratório, e foram utilizados o conjugado estreptoavidina-peroxidase (ZYMED LABORATORIES, Inc. - So, San Francisco, CA, USA) e o padrão IL-4 recombinante (rIL-4) murino (R&D Systems Inc. - Mineapolis, MN, USA) na concentração inicial de 1000 pg/mL. O limite mínimo de detecção foi de 15,625 pg/mL. A leitura das placas foi realizada no leitor SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 405 nm, e a curva padrão foi submetida à regressão linear.

A produção de TNF foi avaliada por ensaio biológico (Lattime e cols., 1988). As amostras de sobrenadante de cultura foram coletadas em condições de esterilidade e, em duplicata, foram diluídas em meio WEHI (RPMI, pH 7,2 acrescido de 10% de SFB previamente inativado a 56°C/30 min, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina e 1 mL de solução de aminoácidos não essenciais cem vezes concentrada (890 mg/mL de L-alanina, 1320 mg/mL de L-asparagina, 1330 mg/mL de L-ácido aspártico, 1470 mg/mL de L-ácido glutâmico, 750 mg/mL de L-glicina, 1150 mg/mL de L-prolina e 1050 mg/mL de L-serina) em placa de fundo chato de 96 poços. Para esta diluição foram utilizados, em duplicata, 35 µL da amostra diluída em 100 µL de meio WEHI, pH 7,2 no

primeiro poço (diluição 1:4) e 35 µL da diluição do primeiro poço em 100 µL de meio WEHI, pH 7,2 no segundo poço (diluição 1:16). Foi preparado, também em duplicata, o padrão TNF recombinante (rTNF) murino (R&D Systems Inc. - Mineapolis, MN, USA) na concentração inicial de 2500 pg/mL em 12 diluições seriadas 1:4. Foram preparadas uma linha com 150 µL de meio WEHI, pH 7,2 (branco de meio) e outra com 100 µL do mesmo meio (branco de células). Foram adicionados 50 µL de uma suspensão a $1,0 \times 10^6$ /mL de células WEHI-164 tratadas com actinomicina D (SIGMA – St. Louis, MO, USA) na concentração de 0,75 µg/mL a todos os poços, exceto nos correspondentes ao branco meio, e a placa foi incubada em estufa a 37°C/5% de CO₂/24 horas. Foram adicionados 20 µL de solução estoque de 3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (SIGMA – St. Louis, MO, USA) a 2,5 mg/mL em cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37°C/5% de CO₂/4 horas. A seguir, foram adicionados 100 µL de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) (VETEC - Rio de Janeiro, RJ, BR) 10% em HCl 0,01 M e a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C/5% de CO₂/16 horas. O limite mínimo de detecção foi de 0,01 pg/mL. As leituras foram realizadas no leitor SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 570 nm, e a curva padrão foi submetida à regressão log-logit.

As dosagens de óxido nítrico foram feitas pelo método de Greiss (Green e cols., 1982). Em placa de fundo chato de 96 poços, uma curva padrão foi preparada pela adição de 50 µL de padrão de nitrito de sódio 250 µM, em duplicata, a 50 µL de DMEM, pH 7,2 realizando-se, a partir daí, 12 diluições sucessivas 1:2 em poços contendo 50 µL do mesmo meio. Em seguida, foram adicionados, em duplicata, 100 µL de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%) a 50 µL de sobrenadante de cultura (amostra), 50 µL de DMEM, pH 7,2 (branco) e aos poços dos padrões. Após 10 minutos em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das amostras, branco e padrões no leitor SOFTmax[®] PRO 4.0 - Life Sciences Edition, sob comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi submetida à regressão linear e o limite mínimo de detecção foi de 4 µM.

Sobrenadantes de cultura coletados após 24 horas foram utilizados para dosagem de TNF e sobrenadantes de 72 horas foram utilizados para dosagem de IFN- γ , IL-4 e óxido nítrico.

Experimentos de imunização

Os animais foram vacinados pela via intramuscular ou subcutânea, com intervalo de três semanas entre a primeira dose e o reforço. Para as aplicações intramusculares, os camundongos foram anestesiados com 200 μ L de Tribromoetanol 2,5% (1 mL/100 g de peso corporal). As injeções intramusculares foram feitas perpendicularmente à região anterior mediana do músculo da coxa direita (Sukumaran e cols., 2002) e as subcutâneas na região posterior da pata direita (Gurunathan e cols., 1997), conforme apresentado a seguir:

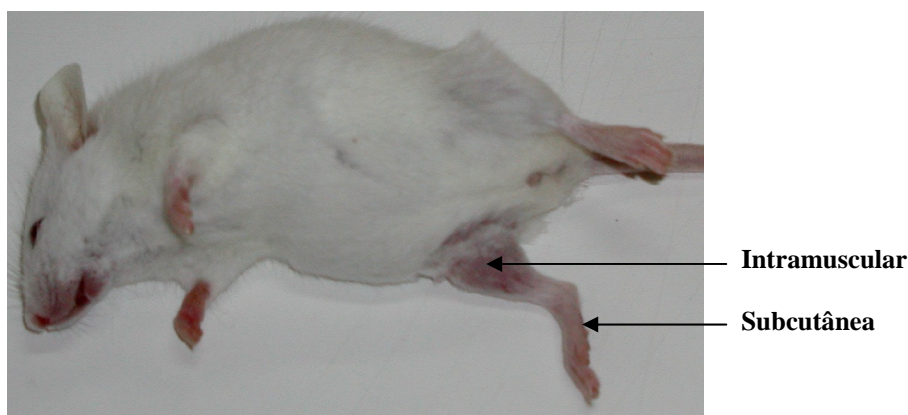


Figura 1. Sítios de vacinação intramuscular e subcutânea em camundongo BALB/c. As setas indicam o sítio de vacinação intramuscular (região anterior mediana do músculo da coxa direita) e subcutânea (região posterior da pata direita).

Foram utilizados 100 μ g de DNA pCI-neo controle ou pCI-neo com inserto do gen p36(LACK) (pCI-neo-p36(LACK)) - na primeira e na segunda dose, tanto nas vacinações intramusculares quanto nas subcutâneas, contidos num volume de 50 μ L por dose (Gurunathan e cols., 1997; Sukumaran e cols., 2002). Para degeneração das células musculares, o DNA pCI-neo-p36(LACK) e o DNA controle pCI-neo para injeção

intramuscular foram preparados em solução de sacarose (Sigma ULTRA - St. Louis, MO, USA) a 25%, enquanto que os mesmos para injeção subcutânea foram diluídos em PBS esterilizado. Utilizou-se um grupo controle com PBS esterilizado administrado em ambas as vias, num volume de 50 µL.

Plasmídeos

Culturas de bactérias *Escherichia coli* DH-5α™ transformadas com os plasmídeos pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dr^a Ana Paula Fernandes, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os genes p36(LACK) foram obtidos por PCR de genes de *L. chagasi* e inseridos em promotor CMV no sítio *EcoRI/XbaI* do plasmídeo pCI-neo. Este plasmídeo é um forte vetor de expressão em mamíferos que, além dessa forte região promotora, possui 1- um gen que codifica a neomicina fosfotransferase, que é um marcador seletivo para células de mamíferos, 2- um íntron quimérico “downstream” à região promotora que aumenta o nível de expressão gênica, 3- promotores de RNA polimerase T3 e T7 flanqueando o sítio múltiplo de clonagem, que podem ser utilizados para sintetizar RNA de maneira “sense” e “antisense” em relação ao inserto, 4- um sítio múltiplo de clonagem com sítios de enzimas de restrição imediatamente “downstream” ao promotor T7, 5- um sinal de poliadenilação SV40 que finaliza a transcrição pela RNA polimerase II e leva à adição de aproximadamente 200 a 250 resíduos de adenosina ao final 3’ do transcrito de RNA, aumentando a estabilidade e tradução do RNA, 6- uma origem de replicação do fago filamentoso f1 para geração de DNA de fita única (ssDNA) encapsulado após infecção da bactéria transformada com um fago auxiliar apropriado, 7- um gen da neomicina fosfotransferase sob regulação de um promotor de SV40, que confere, por intermédio de inativação por fosforilação, resistência ao antibiótico G418, um aminoglicosídeo produzido por estreptomicetos que induz citotoxicidade pelo bloqueio de tradução, e 8- um gen de resistência à ampicilina (Promega, 1996):

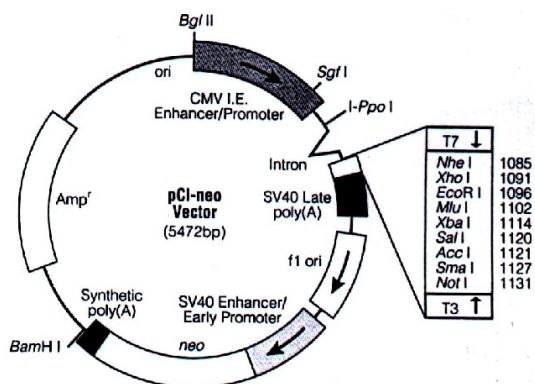


Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pCI-neo. A partir do topo da figura estão representados: a região promotora de CMV, o íntron quimérico, o sítio múltiplo de clonagem, o sinal de poliadenilação SV40, a origem de replicação do fago filamentososo f1, o promotor de SV40, o gen da neomicina fosfotransferase e o gen da ampicilina.

Cultura de bactérias, extração e purificação dos plasmídeos

As bactérias DH-5 α TM (transformadas com pCI-neo ou pCI-neo-p36(LACK)) foram mantidas em meio Luria-Bertaine (LB) sólido, pH 7,0 (NaCl 0,5%, triptona (BIOBRÁS - Montes Claros, MG, BR) 1%, extrato de levedura (BIOBRÁS - Montes Claros, MG, BR) 0,5%, ágar bacteriológico (BIOBRÁS - Montes Claros, MG, BR) 1,5% e D[-]- α -Aminobenzilpenicilina - Sal Dissódico (SIGMA – St. Louis, MO, USA) na concentração final de 100 μ g/mL). Após estriamento, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 16 h e armazenada a 4°C até, no máximo, 15 dias para fornecimento de colônias para expansão em meio líquido. A partir de quatro a seis colônias obtidas do meio sólido, foi preparado um pré-inóculo de 5 mL em meio LB líquido, pH 7,0 (NaCl 0,5%, triptona (BIOBRÁS - Montes Claros, MG, BR) 1%, extrato de levedura (BIOBRÁS - Montes Claros, MG, BR) 0,5% e D[-]- α -Aminobenzilpenicilina - Sal Dissódico na concentração final de 100 μ g/mL). O pré-inóculo foi incubado em agitador orbital a 160 rpm/37°C/16 h. Essa cultura foi expandida a 500 mL em meio LB líquido e incubada em agitador orbital a 160 rpm/37°C/16 h para a extração e purificação do DNA plasmidial.

O processo de extração e purificação do DNA foi feito conforme protocolo descrito no kit Wizard[®] Plus Maxipreps (PROMEGA CORPORATION - Madison, WI, USA). Resumidamente, toda a cultura foi centrifugada a 5800 x g/23°C/10 min, o sedimento foi ressuspendido em solução de ressuspensão celular (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/mL) e solução de lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%), misturando-se bem. Após isso, foi adicionada solução de neutralização (acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8), misturando-se bem. A mistura foi centrifugada a 4000 x g/23°C/20 min e o sobrenadante filtrado em papel de filtro (Whatman qualitativo 1). O volume obtido foi medido e foi adicionada metade do mesmo de isopropanol PA (SIGMA – St. Louis, MO, USA). Após agitação, o preparado foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugado a 4000 x g/23°C/20 min, e o sedimento com o DNA extraído foi ressuspendido em 2 mL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e EDTA 1 mM). Para o processo de purificação, a resina (Wizard[®] Maxipreps DNA Purification Resin) foi homogeneizada e adicionada à suspensão de DNA, agitando-se. A mistura foi adicionada à coluna (Maxicolumn - Promega) ligada a uma bomba de vácuo e submetida a uma pressão de 15-18 mmHg até que todo o líquido fosse eluído, evitando-se a secagem total da resina que foi, a seguir, eluída com solução de lavagem (Acetato de potássio 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM, pH 7,5 e EDTA 40 µM) e etanol 80%. Após terminada a eluição, o vácuo foi mantido por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugada a 1070 x g/16°C/15 min em rotor móvel. O vácuo foi aplicado por mais 5 minutos e foi adicionada água milli Q autoclavada, à temperatura de 60-70°C, à resina, com a coluna dentro de um tubo de fundo cônico de 50 mL fornecido pelo kit. Após 1 minuto, a coluna, mantida no tubo, foi centrifugada a 1070 x g/16°C/5 min e a solução de DNA retida foi filtrada em filtro de seringa de 0,2 µM. Ao final, foram adicionados 10% do volume obtido de tampão Tris EDTA (TE) 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 e EDTA 10 mM) autoclavado à solução, que foi posteriormente armazenada a 4°C por, no máximo, 6 meses.

Preparo do DNA para vacinação

O DNA purificado foi diluído em água milli Q e submetido às leituras de D.O. (Densidade Ótica) em espectrofotômetro sob os comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros para quantificação de DNA e proteínas, respectivamente (Sambrook e cols., 1989; Boyer, 1993). Relações de leituras 260/280 nm superiores a 1,70 foram consideradas como satisfatórias para a utilização do DNA no processo de vacinação. O cálculo da concentração de DNA nas amostras foi feito de acordo com a seguinte relação (Boyer, 1993):

$$\begin{array}{l} 1 \text{ D.O. }_{260 \text{ nm}} \longrightarrow 50 \text{ } \mu\text{g/mL} \longrightarrow 0,05 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L} \\ \text{D.O. (amostra) }_{260 \text{ nm}} \longrightarrow [\text{DNA}] \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} \end{array}$$

$$[\text{DNA}] \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = \text{D.O. }_{260 \text{ nm}} \text{ (amostra)} \times 0,05 \times d$$

Onde:

[DNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = concentração de DNA na amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

D.O. $_{260 \text{ nm}}$ (amostra) = densidade ótica da amostra a 260 nm

d = diluição da amostra

Para fins de cálculo, foi traçada uma curva padrão para quantificação de DNA onde, a partir de uma solução de concentração conhecida (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foram feitas leituras a 260 nm de diversas diluições aquosas da solução inicial de DNA em espectrofotômetro (UV Visible Spectrophotometer UV-1601 - Shimadzu), gerando-se a seguinte curva:

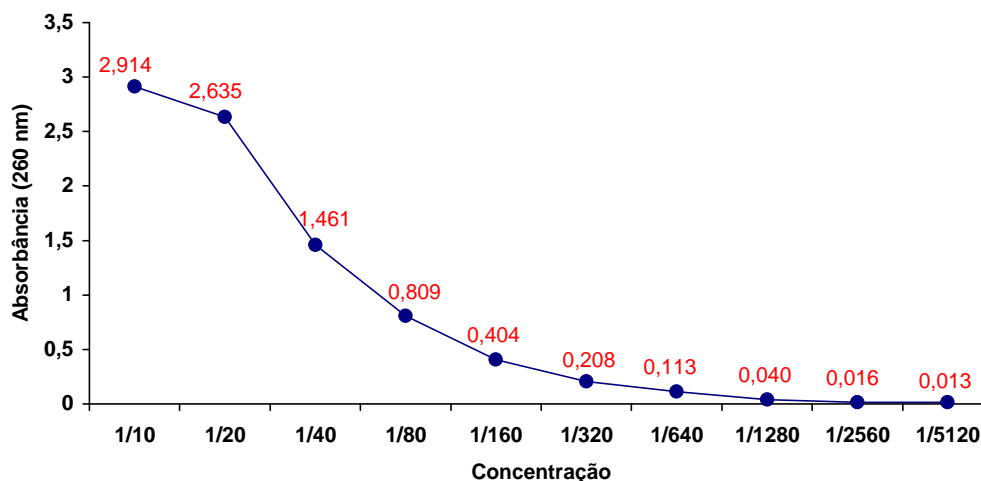


Figura 3. Curva padrão para quantificação de DNA. Os pontos representam as absorbâncias a 260 nm relativas a diferentes diluições de DNA a partir de uma solução aquosa a 150 µg/mL.

De acordo com a Lei de Beer-Lambert (Downes, 1972; Boyer, 1993) e com o limite máximo confiável de leitura, os valores aceitáveis de absorbância (correspondentes à parte linear da curva) ficaram entre 0,113 e 2,000. Este foi o limite de leitura utilizado para os cálculos de concentração de DNA nas amostras.

Após dosado o DNA (pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK)), as amostras foram reunidas e o material foi concentrado (Speed Vac[®] System Thermo Savant - ISS110), até concentração superior a 3 µg/µL, limite mínimo aproximado para a obtenção de DNA na concentração desejada para a vacina.

Antes de se preparar a vacina, os plasmídeos (pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK)) foram submetidos ao corte com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Xba* I seguido de eletroforese em gel de agarose (ultra PURE - Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, USA) a 0,8% em Tris Acetato EDTA (TAE), com o objetivo de se verificar a presença do inserto de 939 pb correspondente ao gen p36(LACK) no plasmídeo pCI-neo-p36(LACK) e do restante do plasmídeo (5472 pb) nos dois DNAs, além da verificação da presença de RNA e bandas inespecíficas. Foram utilizados, para a digestão, 3 µg de DNA, 0,2 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 100X (PROMEGA CORPORATION - Madison, WI, USA), 1,0 µL

de cada enzima (PROMEGA CORPORATION - Madison, WI, USA) e 2 μL de tampão “multi-core” 10X (PROMEGA CORPORATION - Madison, WI, USA). O volume foi completado para 20 μL com água milli Q e o material foi incubado em banho-maria a 37°C/2 h. Para a eletroforese, foram adicionados 4 μL de tampão de amostra Blue/Orange 6X Loading Dye (PROMEGA CORPORATION - Madison, WI, USA) aos DNAs digeridos. Foi utilizado 1,5 μg de cada DNA não digerido, 1,67 μL do tampão de amostra e o volume foi completado para 10 μL com água milli Q. Como padrão, foram utilizados 5 μL de 1 Kb DNA Ladder (GIBCO BRL - Grand Island, NY, USA), adicionados a 1,67 μL do tampão de amostra e água milli Q com volume suficiente para 10 μL . O gel foi preparado a 0,8% em agarose diluída em TAE 1X, pH 7,2 (tris base 4,84%, acetato de sódio anidro 1,64% e EDTA dissódico.2 H₂O 0,39%) e procedeu-se a corrida eletroforética em tampão TAE 1X, pH 7,2 com 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de brometo de etídio (ultra PURE - GIBCO BRL - Grand Island, NY, USA) a 10 mg/mL, a 50 V/3 h.

As soluções concentradas dos plasmídeos foram utilizadas com volumes correspondentes a 100 μg de DNA para cada dose de vacina (50 μL). Para as vacinações intramusculares, foi adicionada sacarose na concentração final de 25% a partir de uma solução estoque a 0,8 g/mL. O volume foi completado para 50 $\mu\text{L}/\text{dose}$ com água milli Q esterilizada. Para as vacinações subcutâneas, foi adicionado PBS esterilizado à solução concentrada de DNA em volume suficiente para se completarem 50 $\mu\text{L}/\text{dose}$. O procedimento foi idêntico para ambos os plasmídeos utilizados (pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK)).

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados provenientes de quantificação de parasitos, os valores foram transformados em logaritmos para homogeneização de variância. Esses dados e os provenientes de dosagens de citocinas e óxido nítrico que apresentaram distribuição normal pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foram submetidos ao Teste t de Student. Dados cuja distribuição não foi considerada linear pelo teste de

Kolmogorov-Smirnov foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para todas as análises estatísticas, as diferenças significativas foram aceitas ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$) (Sampaio, 1998).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Eletroforese em gel de agarose dos DNAs extraídos e purificados

O ponto de partida para os experimentos de vacinação foram os processos de extração e purificação dos plasmídeos pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK). Após extraídos e purificados, os DNAs foram submetidos ao corte com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Xba* I e à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para constatação da presença do inserto p36(LACK), de possíveis bandas inespecíficas ou de RNA na amostra (Fig. 4). Esta figura mostra a presença do inserto de 939 pb referente ao gen p36(LACK) proveniente do plasmídeo pCI-neo-p36(LACK) cortado (A), das conformações espiralada (banda inferior) e não espiralada (banda superior) dos plasmídeos pCI-neo-p36(LACK) e pCI-neo íntegros (B e D, respectivamente) e do plasmídeo pCI-neo cortado (C). Não foram observadas bandas inespecíficas ou presença de RNA.

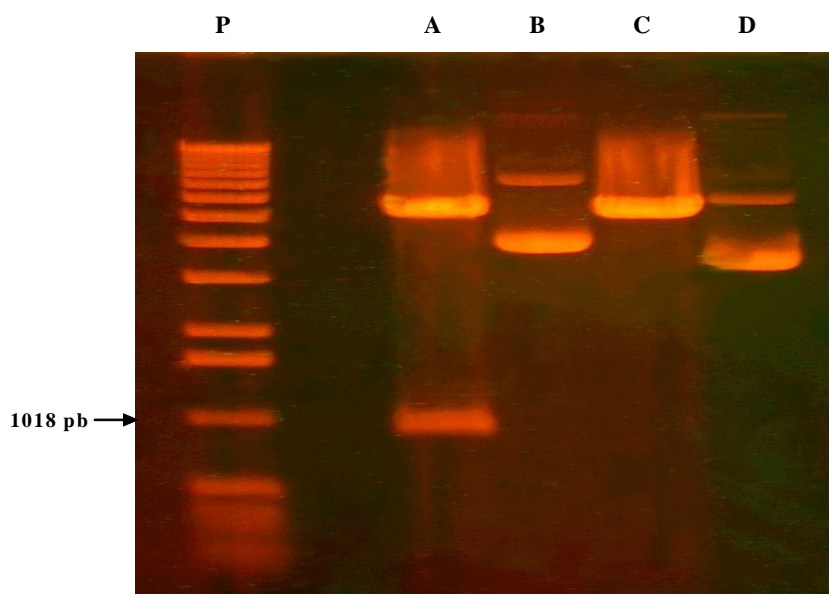


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos plasmídeos utilizados para a vacinação. (A) Plasmídeo pCI-neo-p36(LACK) digerido pelas enzimas *EcoR* I e *Xba* I, (B) o mesmo plasmídeo não digerido, (C) plasmídeo pCI-neo digerido pelas enzimas *EcoR* I e *Xba* I, (D) o mesmo plasmídeo não digerido e (P) Padrão de 1 Kb DNA Ladder.

Curva de crescimento de L. chagasi M2682

A cepa M2682 de *L. chagasi* foi cultivada a partir da concentração de 1×10^5 promastigotas/mL e a cultura foi quantificada para a montagem de uma curva de crescimento (Fig. 5). De acordo com essa curva, após 120 horas (5 dias) a cultura atingiu o final da fase logarítmica de crescimento com aproximadamente $6,5 \times 10^7$ *Leishmania*/mL. Em virtude disso, escolhemos o tempo de 5 dias de cultura, partindo sempre de uma cultura de 1×10^5 promastigotas/mL, para a obtenção dos parasitos para os experimentos de desafio e preparo de antígenos.

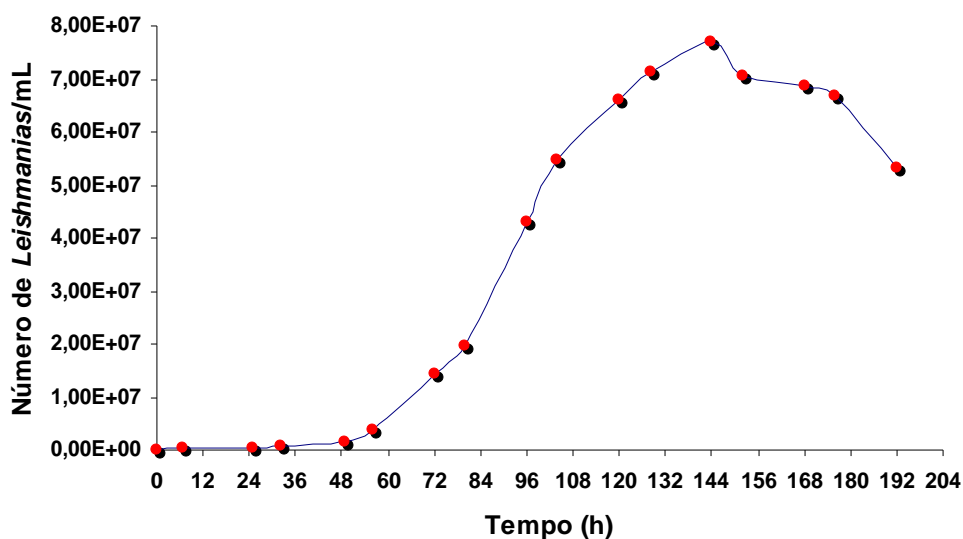


Figura 5. Curva de crescimento de *L. chagasi* M2682 em DMEM 20% SFB, pH 6,8. Cultura iniciada com 1×10^5 parasitos/mL foi mantida em estufa a 25°C e quantificada nos tempos marcados.

*Determinação da curva de carga parasitária no baço e no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi**

Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^7 promastigotas de final de fase logarítmica de *L. chagasi* na veia da cauda e, após 2, 4 e 6 semanas, a carga parasitária no baço e no fígado foi avaliada pela técnica de diluição limitante. De acordo com os resultados, observou-se um pico de carga parasitária no fígado 4 semanas após a infecção ($P < 0,01$ em relação a 2 semanas), com posterior diminuição em 6 semanas ($P < 0,05$). No baço, sítio de infecção crônica por *L. chagasi* em camundongos BALB/c (Wilson e cols., 1996), a carga parasitária se elevou de 2 para 4 semanas ($P < 0,01$) e se manteve em níveis mais baixos em relação ao fígado ($P < 0,01$) durante todo o período de infecção analisado (Fig. 6). Comparando-se as cargas parasitárias por miligrama de tecido, o baço manteve-se com valores mais baixos até 4 semanas ($P < 0,05$) (dados não mostrados).

De acordo com esses dados, nos experimentos de vacinação, os camundongos foram desafiados pela via endovenosa com 1×10^7 promastigotas totais de *L. chagasi* e sacrificados 4 semanas após a infecção, tempo correspondente ao pico de carga parasitária no fígado.

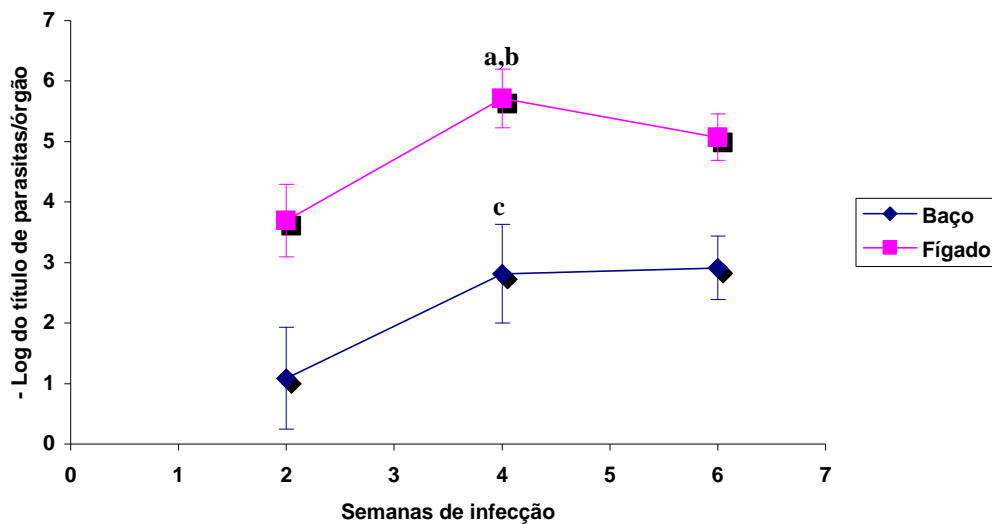


Figura 6. Curso de infecção por *L. chagasi* em camundongos BALB/c. Os camundongos foram infectados i.v. com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* e sacrificados após 2, 4 e 6 semanas para a determinação da carga parasitária, conforme descrito em *Material e Métodos*. O parasitismo hepático foi maior em 4 semanas após infecção se comparado com 2 semanas (**a**) ($P < 0,01$) e com 6 semanas (**b**) ($P < 0,05$). No baço, o parasitismo foi maior em 4 semanas após infecção se comparado com 2 semanas (**c**) ($P < 0,01$). Foram utilizados três camundongos por grupo e os pontos são representativos das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes \pm desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo Teste t de Student.

Verificação do padrão de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e óxido nítrico em 2, 4 e 6 semanas de infecção

Além da determinação da curva de carga parasitária no baço e no fígado em 2, 4 e 6 semanas após infecção, dosaram-se as citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e o óxido nítrico produzidos por esplenócitos obtidos nos mesmos tempos.

Células do baço de camundongos infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* estimuladas em cultura com 50 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno particulado produziram quantidades significativas de IFN- γ em 2, 4 e 6 semanas em relação ao produzido pelas não estimuladas ($P < 0,01$). Não houve diferenças na produção da citocina quando os grupos submetidos ao estímulo foram comparados entre si (Fig. 7).

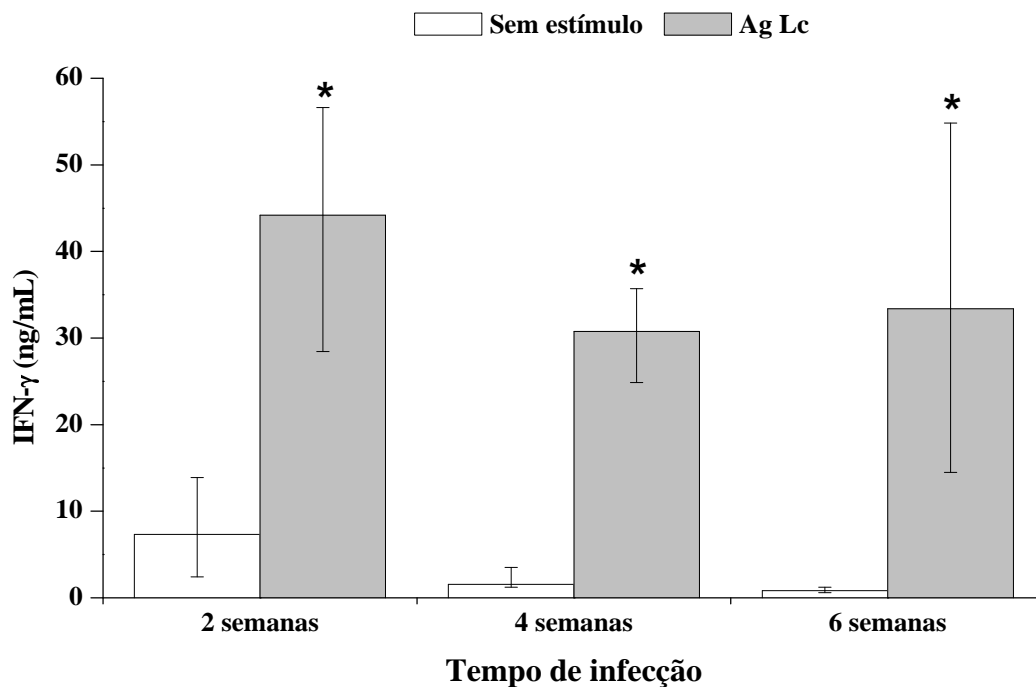


Figura 7. Produção de IFN- γ em 2, 4 e 6 semanas de infecção. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^7 *Leishmania* na veia da cauda e o IFN- γ esplênico foi dosado pela técnica de ELISA em sobrenadantes de cultura sem estímulo ou estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* (Ag Lc) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram utilizados dois a três camundongos por grupo e as barras indicam as medianas dos dados combinados de dois experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. Diferenças estatísticas entre a produção da citocina pelos grupos estimulados e seus respectivos controles não estimulados foram determinadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $P < 0,01$).

A citocina IL-4 também foi dosada conforme feito para o IFN- γ . De maneira semelhante à observada para o IFN- γ , houve produção significativa de IL-4 pelos esplenócitos estimulados com antígeno particulado em comparação aos seus respectivos controles, mas não houve diferenças quando os grupos estimulados foram comparados entre si (Fig. 8), sugerindo que ambas as citocinas se mantêm, no baço, sem alteração de nível durante a infecção, nos tempos analisados.

Não houve produção significativa de TNF ou óxido nítrico por esplenócitos em quaisquer dos grupos analisados (dados não mostrados).

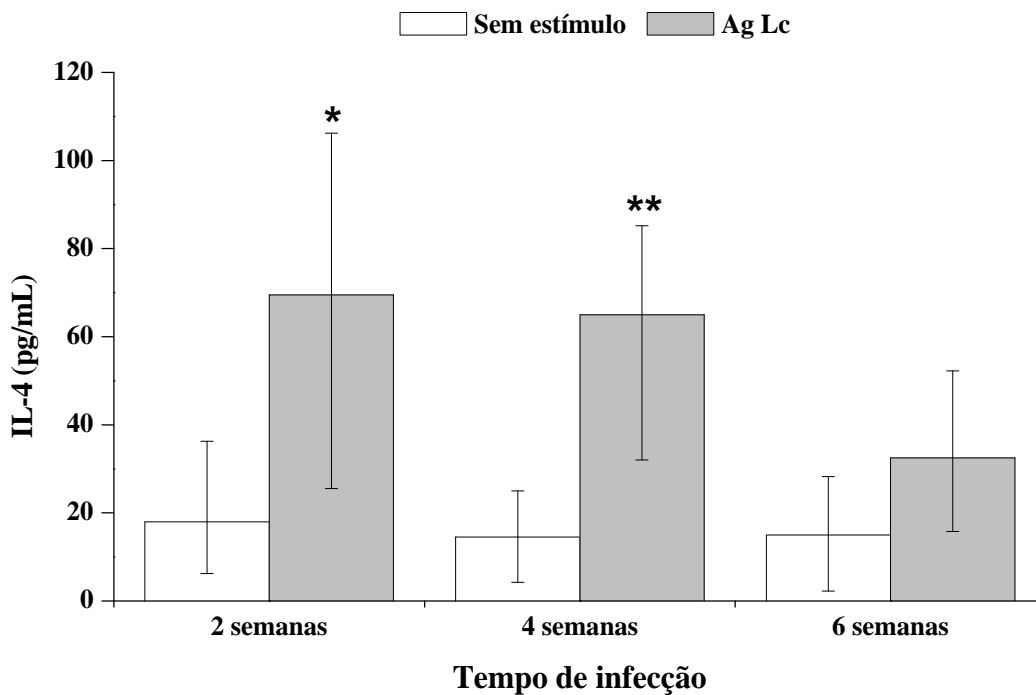


Figura 8. Produção de IL-4 em 2, 4 e 6 semanas de infecção. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1×10^7 *Leishmania* na veia da cauda e o IL-4 esplênico foi dosado pela técnica de ELISA em sobrenadantes de cultura sem estímulo ou estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* (Ag Lc) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram utilizados dois a três camundongos por grupo e as barras indicam as medianas dos dados combinados de dois experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. Diferenças estatísticas entre a produção da citocina pelos grupos estimulados e seus respectivos controles não estimulados foram determinadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$).

Verificação da capacidade de indução de resposta imunológica pela vacina de DNA p36(LACK)

Com o intuito de se verificar a capacidade imunogênica da vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK), camundongos BALB/c foram vacinados conforme descrito em *Material e Métodos* e, duas semanas após a dose de reforço, foram sacrificados para a retirada do baço. Os esplenócitos foram submetidos, em cultura, aos estímulos com antígenos solúvel e particulado de *L. chagasi* e proteína p36(LACK) recombinante para a dosagem de IFN- γ , IL-4 e óxido nítrico, e antígenos solúvel e particulado para a dosagem de TNF nos sobrenadantes.

Esplenócitos de camundongos vacinados pela via subcutânea não apresentaram produção significativa de IFN- γ ou IL-4 , tanto quando a comparação é feita entre a produção por esplenócitos de camundongos do mesmo grupo e submetidos a estímulos diferentes quanto entre os de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) e seus respectivos controles inoculados com PBS ou pCI-neo (Figs. 9 e 10). Também não foi detectada produção de óxido nítrico ou de TNF por esplenócitos desses camundongos (dados não mostrados).

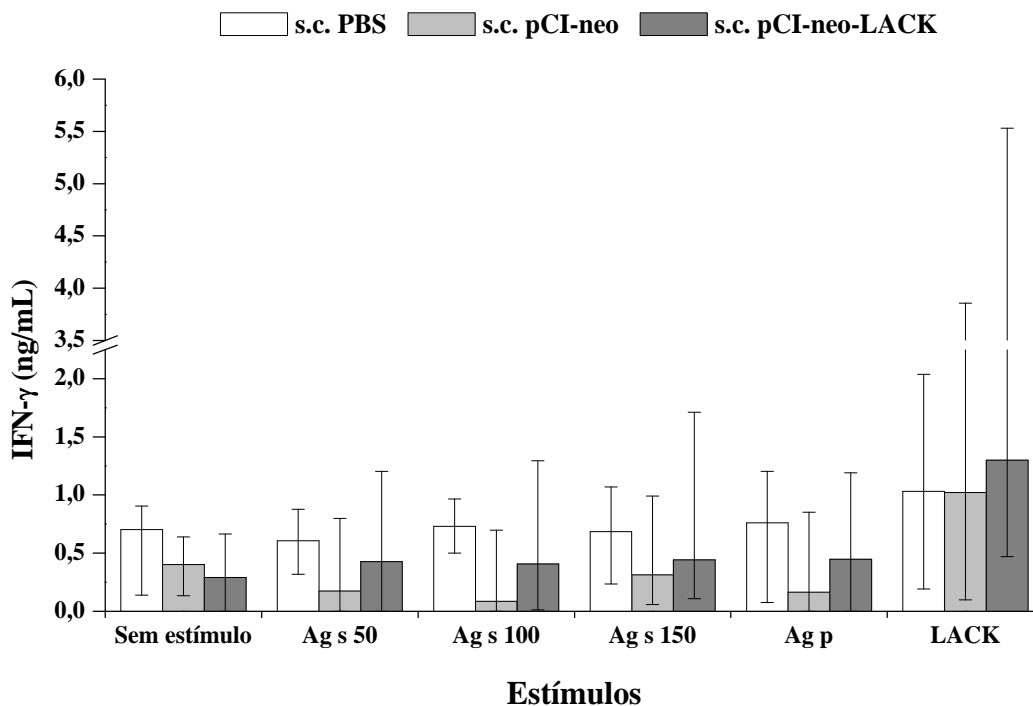


Figura 9. Produção de IFN- γ por esplenócitos após vacinação subcutânea com pCI-neo-p36(LACK). Camundongos BALB/c foram vacinados pela via subcutânea com 100 μ g de DNA (pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK)) em doses de 50 μ L em PBS ou inoculados com 50 μ L de PBS (controle). Três semanas depois, foi administrada, pela mesma via, uma dose de reforço com as mesmas quantidades e concentrações. Duas semanas após o reforço, os camundongos foram sacrificados e o IFN- γ foi dosado por ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos aos estímulos com antígeno solúvel (Ag s 50, 100 e 150 μ g/mL) e particulado (Ag p - 50 μ g/mL) de *L. chagasi* e proteína p36(LACK) (LACK - 5 μ g/mL) ou sem estímulo. Foram utilizados três camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de 2 experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

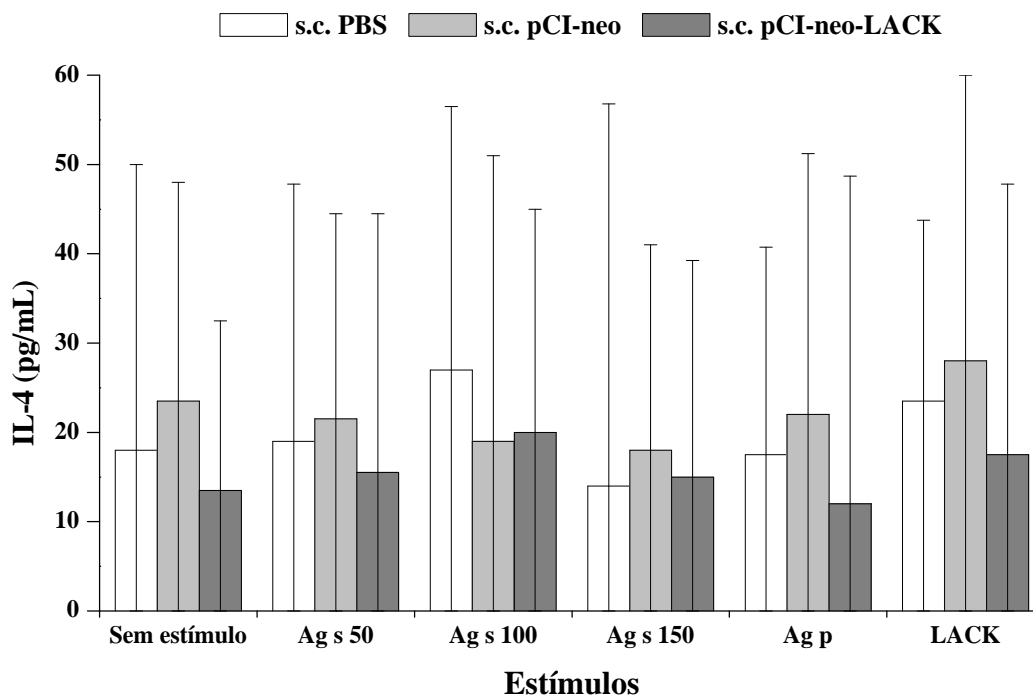


Figura 10. Produção de IL-4 por esplenócitos após vacinação subcutânea com pCI-neo-p36(LACK). Camundongos BALB/c foram vacinados pela via subcutânea com 100 μ g de DNA (pCI-neo e pCI-neo-p36(LACK)) em doses de 50 μ L em PBS ou inoculados com 50 μ L de PBS (controle). Três semanas depois, foi administrada, pela mesma via, uma dose de reforço com as mesmas quantidades e concentrações. Duas semanas após o reforço, os camundongos foram sacrificados e o IL-4 foi dosado por ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos aos estímulos com antígeno solúvel (Ag s 50, 100 e 150 μ g/mL) e particulado (Ag p - 50 μ g/mL) de *L. chagasi* e proteína p36(LACK) (LACK - 5 μ g/mL) ou sem estímulo. Foram utilizados três camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de 2 experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Esplenócitos de camundongos vacinados com DNA pCI-neo-p36(LACK) pela via intramuscular mostraram produção significativa de IFN- γ quando submetidos a diferentes estímulos (50, 100 e 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno solúvel, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno particulado e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína p36(LACK)) se comparada com a de grupos controle inoculados com PBS ou pCI-neo ou com a de células não estimuladas em cultura (Fig. 11).

Detalhadamente, esplenócitos de camundongos vacinados com DNA pCI-neo-p36(LACK) e estimulados com antígeno solúvel (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou particulado produziram quantidades significativas de IFN- γ se comparadas com as de esplenócitos de camundongos vacinados e não estimulados em cultura ($P<0,05$). O mesmo ocorreu com camundongos vacinados com DNA pCI-neo-p36(LACK) cujos esplenócitos foram estimulados com antígeno solúvel (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou proteína p36(LACK) se comparados com camundongos vacinados e não estimulados ($P<0,01$).

A indução da produção de IFN- γ pela vacina também foi observada em camundongos vacinados com DNA pCI-neo-p36(LACK) cujos esplenócitos foram estimulados com 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno solúvel se comparados com a de camundongos tratados com PBS e com esplenócitos submetidos ao mesmo estímulo ($P<0,05$). O mesmo ocorreu quando esplenócitos de camundongos vacinados foram estimulados com antígeno solúvel (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou proteína p36(LACK) se comparados com esplenócitos de camundongos tratados com PBS submetidos aos respectivos estímulos ($P<0,01$).

Quando comparados com esplenócitos de camundongos inoculados com o plasmídeo pCI-neo cujas células do baço foram estimuladas com antígeno solúvel (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou proteína p36(LACK), esplenócitos de camundongos vacinados tratados com os mesmos estímulos também apresentaram produção significativa de IFN- γ ($P<0,05$).

Esplenócitos do grupo controle (pCI-neo) estimulados com proteína p36(LACK) também produziram mais IFN- γ se comparados com o mesmo grupo controle não estimulado ($P<0,05$).

Nenhuma produção significativa de IL-4 foi detectada entre os diferentes grupos vacinados pela via intramuscular (Fig. 12). Também não houve produção significativa de TNF ou de óxido nítrico entre os grupos (dados não mostrados).

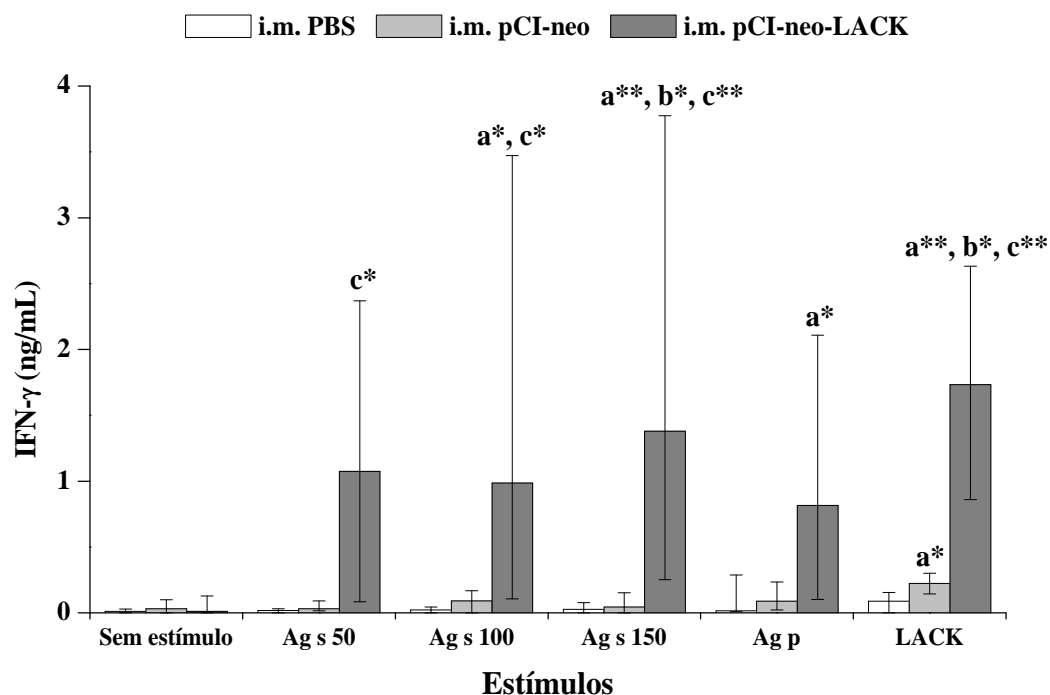


Figura 11. Produção de IFN- γ por esplenócitos após vacinação intramuscular com pCI-neo-p36(LACK). Camundongos BALB/c foram vacinados pela via intramuscular e sacrificados para retirada do baço para a dosagem de IFN- γ , conforme feito para a via subcutânea e descrito em *Material e Métodos*. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas de produção de IFN- γ (*P<0,05 e **P<0,01) nas seguintes comparações: (a) culturas estimuladas x culturas não estimuladas; (b) pCI-neo-p36(LACK) x pCI-neo e (c) pCI-neo-p36(LACK) x PBS. Foram utilizados três camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de 2 experimentos independentes +/- 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

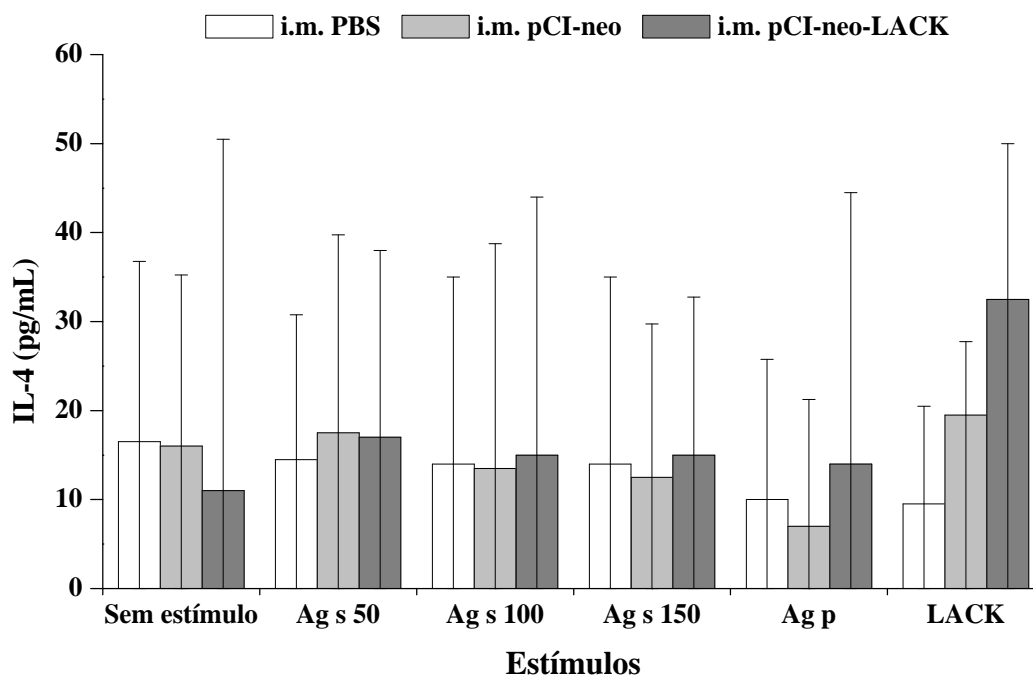


Figura 12. Produção de IL-4 por esplenócitos após vacinação intramuscular com pCI-neo-p36(LACK). Camundongos BALB/c foram vacinados pela via intramuscular e sacrificados para retirada do baço para a dosagem de IL-4, conforme feito para a via subcutânea e descrito em *Material e Métodos*. Foram utilizados três camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de 2 experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Avaliação da carga parasitária no baço e no fígado de camundongos após vacinação com DNA pCI-neo-p36(LACK)

Camundongos BALB/c foram vacinados conforme descrito em *Material e Métodos* e foram desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço. 4 semanas após o desafio - tempo determinado pelo pico de carga parasitária no fígado (Fig. 3) - os camundongos foram sacrificados para a retirada do baço e do fígado para a quantificação de parasitos. Os objetivos desses experimentos foram verificar a capacidade protetora da vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK) por intermédio da determinação da carga parasitária nos órgãos dos camundongos desafiados 4 semanas após o reforço e comparar esses resultados com os obtidos de camundongos desafiados e inoculados com parasito após maior intervalo entre a dose de reforço e o desafio (12 semanas).

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferenças entre as cargas parasitárias tanto esplênicas quanto hepáticas quando grupos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) foram comparados com grupos controle (inoculados com PBS ou pCI-neo) nos experimentos de desafio 4 ou 12 semanas após a dose de reforço. Por outro lado, houve diferenças estatísticas quando foram comparadas as cargas parasitárias tanto hepáticas quanto esplênicas de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) nos diferentes tempos de desafio: camundongos vacinados pela via intramuscular e desafiados 12 semanas após a dose de reforço mostraram menor carga parasitária nos dois órgãos se comparados com o grupo vacinado e desafiado após 4 semanas ($P < 0,05$) (Figs. 13 e 14). O mesmo ocorreu para os baços de camundongos inoculados com pCI-neo pela mesma via ($P < 0,05$) (Fig. 13).

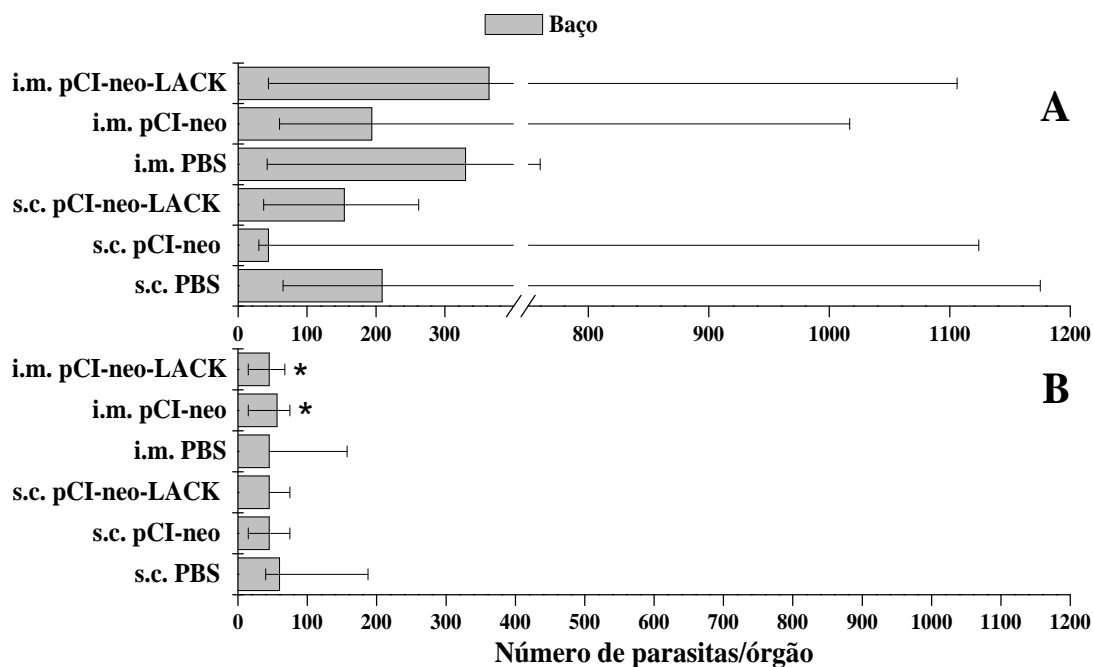


Figura 13. Carga parasitária no baço de camundongos BALB/c vacinados e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço. Camundongos BALB/c foram vacinados conforme descrito em *Material e Métodos* e desafiados pela via endovenosa com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* 4 semanas (**A**) ou 12 semanas (**B**) após a dose de reforço. Após 4 semanas a partir do desafio, os camundongos foram sacrificados e os baços foram retirados para a quantificação de parasitos pela técnica de diluição limitante. Camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) pela via intramuscular apresentaram menor número de parasitos no baço quando desafiados 12 semanas após a dose de reforço em comparação com os camundongos submetidos à mesma vacina, mas desafiados após 4 semanas. O mesmo ocorreu para os camundongos inoculados com pCI-neo. Foram utilizados dois a quatro camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de três experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

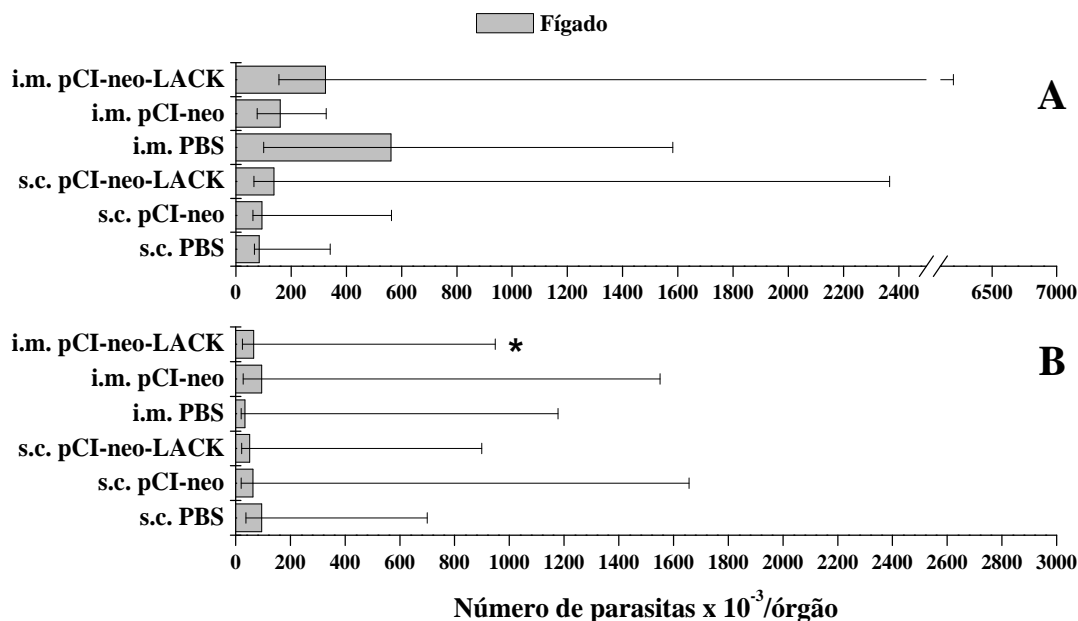


Figura 14. Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c vacinados e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço. Camundongos BALB/c foram vacinados conforme descrito em *Material e Métodos* e desafiados pela via endovenosa com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* 4 semanas (A) ou 12 semanas (B) após a dose de reforço. Após 4 semanas a partir do desafio, os camundongos foram sacrificados e os fígados foram retirados para a quantificação de parasitos pela técnica de diluição limitante. Camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) pela via intramuscular apresentaram menor número de parasitos no fígado quando desafiados 12 semanas após a dose de reforço em comparação com os camundongos submetidos à mesma vacina, mas desafiados após 4 semanas. Foram utilizados dois a quatro camundongos por grupo e as barras representam as medianas dos dados combinados de três experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $P < 0,05$).

*Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos vacinados e desafiados com *L. chagasi* 4 ou 12 semanas após dose de reforço*

Esplenócitos de camundongos desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço foram retirados para a determinação do padrão de citocinas (IFN- γ , IL-4 e TNF) e óxido nítrico produzidos em resposta à vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK).

Esplenócitos de camundongos inoculados tanto pela via intramuscular quanto pela subcutânea com pCI-neo-p36(LACK), pCI-neo ou PBS e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço produziram mais IFN- γ quando estimulados em cultura com antígeno particulado de *L. chagasi* (50 μ g/mL) em relação aos seus respectivos controles (sem estímulo em cultura). Da mesma maneira, esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço que foram estimulados em cultura com antígeno particulado também produziram quantidades significativas de IFN- γ em relação aos de inoculados com pCI-neo e também estimulados em cultura. O mesmo estímulo em cultura também induziu produção significativa dessa citocina por esplenócitos de camundongos desafiados 12 semanas após a vacinação intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) em relação aos de camundongos inoculados com PBS pela mesma via. É interessante notar também que, comparando-se a produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados de camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço com seus correspondentes de 4 semanas, observa-se maior produção dessa citocina nos de 12 semanas para ambas as vias e todos os inóculos, exceto para os vacinados pela via subcutânea com pCI-neo (Fig. 15 - A e B).

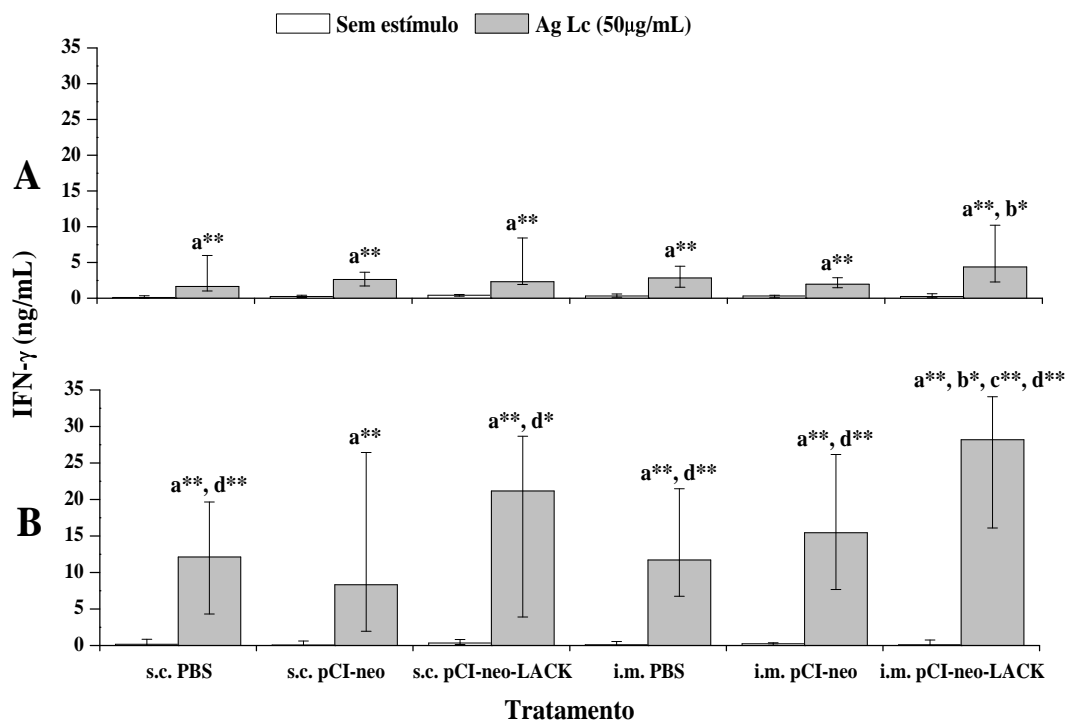


Figura 15. Produção de IFN- γ por esplenócitos após vacinação subcutânea ou intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafio com *L. chagasi*. Camundongos BALB/c foram vacinados pela via subcutânea ou intramuscular conforme descrito em *Material e Métodos*. Após 4 semanas (A) ou 12 semanas (B), eles foram desafiados pela veia da cauda com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* e sacrificados 4 semanas após o desafio para a retirada do baço e dosagem de IFN- γ pela técnica de ELISA em sobrenadante de cultura dos esplenócitos estimulados ou não com antígeno particulado de *L. chagasi* (Ag Lc - 50 μ g/mL). As letras indicam as diferenças estatísticas (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$) nas seguintes comparações: (a) culturas estimuladas x culturas não estimuladas; (b) pCI-neo-p36(LACK) (estímulo) x pCI-neo (estímulo); (c) pCI-neo-p36(LACK) (estímulo) x PBS (estímulo) e (d) culturas estimuladas (A) x culturas estimuladas (B). Foram utilizados dois a quatro camundongos por grupo e os dados são representativos das medianas dos dados combinados de três experimentos independentes $\pm 25\%$ da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Com relação à produção de IL-4, somente esplenócitos de camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço foram capazes de produzir essa citocina frente ao estímulo com antígeno particulado em comparação com seus respectivos controles não estimulados. Somente esplenócitos de camundongos inoculados pela via subcutânea com PBS não apresentaram essa característica (Fig. 16 - B).

Não foi detectada produção de TNF ou de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço (dados não mostrados).

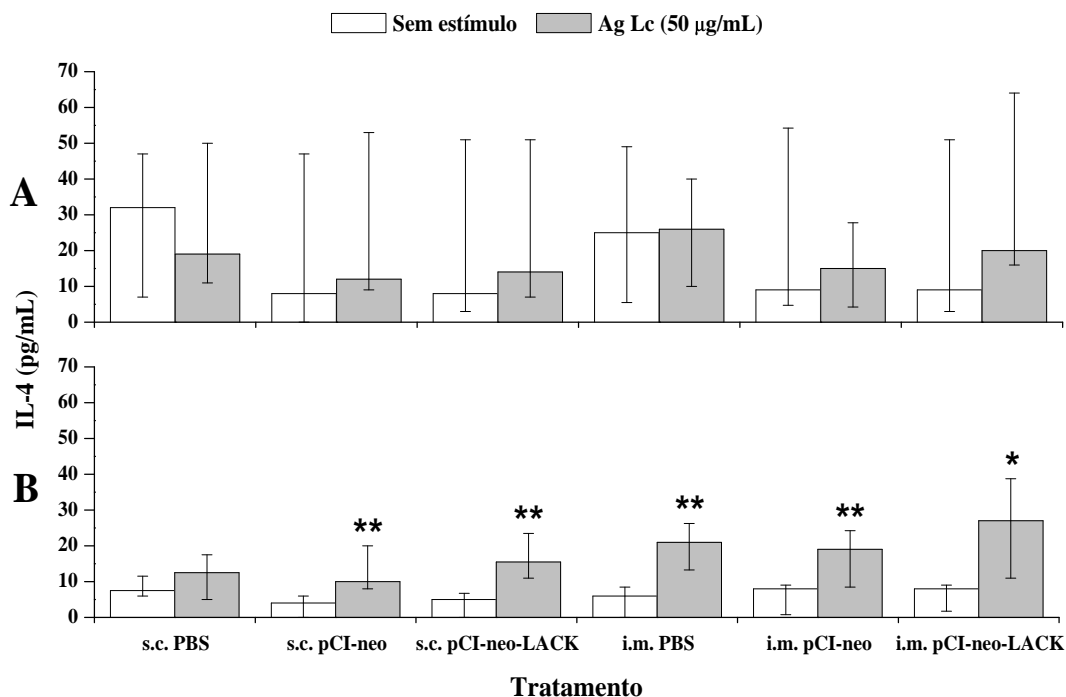


Figura 16. Produção de IL-4 por esplenócitos após vacinação subcutânea ou intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafio com *L. chagasi*. Camundongos BALB/c foram vacinados pela via subcutânea ou intramuscular conforme descrito em *Material e Métodos*. Após 4 semanas (A) ou 12 semanas (B), eles foram desafiados pela veia da cauda com 1×10^7 promastigotas de *L. chagasi* e sacrificados 4 semanas após o desafio para a retirada do baço e dosagem de IL-4 pela técnica de ELISA em sobrenadante de cultura dos esplenócitos estimulados ou não com antígeno particulado de *L. chagasi* (Ag Lc - 50 µg/mL). Foram utilizados dois a quatro camundongos por grupo e os dados são representativos das medianas dos dados combinados de três experimentos independentes \pm 25% da distribuição de frequência representados em relação aos valores das medianas. Diferenças estatísticas entre grupos tratados e estimulados e seus respectivos controles (Sem estímulo) foram determinadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$).

6. *SUMÁRIO*

6. SUMÁRIO

- ✓ Houve produção significativa de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo-p36(LACK), estimulados com antígeno solúvel ou particulado de *L. chagasi* ou com proteína p36(LACK);
- ✓ A inoculação de pCI-neo pela via intramuscular também induziu produção significativa de IFN- γ por esplenócitos de camundongos, após estímulo com proteína p36(LACK);
- ✓ Não houve produção significativa de TNF por esplenócitos de camundongos inoculados pela via intramuscular com pCI-neo, estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi*. O mesmo ocorreu com esplenócitos de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) pela via subcutânea e submetidos ao mesmo estímulo;
- ✓ Não houve produção significativa de IL-4 ou de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos vacinados pela via subcutânea ou intramuscular, estimulados com antígeno solúvel ou particulado de *L. chagasi* ou proteína p36(LACK). O mesmo ocorreu para a produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados pela via subcutânea;
- ✓ Não houve diminuição significativa de carga parasitária no baço e no fígado de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço em relação aos seus respectivos controles (pCI-neo ou PBS);
- ✓ Houve diminuição significativa de carga parasitária no baço de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) ou inoculados com pCI-neo, desafiados 12 semanas após a dose de reforço em relação aos mesmos grupos desafiados após 4 semanas. O mesmo ocorreu com a carga parasitária hepática de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK);
- ✓ Houve maior produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* dos grupos tratados (pCI-neo-p36(LACK) e PBS pela via subcutânea e pCI-neo-p36(LACK), pCI-neo e PBS pela via intramuscular) de

camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço em relação aos respectivos grupos de camundongos desafiados após 4 semanas;

- ✓ Houve maior produção de IFN- γ por esplenócitos de todos os grupos (vacinado e controles) estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* em relação à de esplenócitos não estimulados, considerando-se as duas vias de administração utilizadas e os tempos de desafio (4 ou 12 semanas) após a dose de reforço. O mesmo ocorreu para a produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) em relação à dos esplenócitos estimulados de camundongos inoculados com pCI-neo (desafio 4 ou 12 semanas de desafio pós-vacinação) e em relação à dos esplenócitos estimulados de camundongos inoculados com PBS (12 semanas);
- ✓ Houve produção de IL-4 por esplenócitos estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* dos grupos tratados (pCI-neo-p36(LACK) e pCI-neo pela via subcutânea e pCI-neo-p36(LACK), pCI-neo e PBS pela via intramuscular) em relação à de esplenócitos não estimulados dos respectivos grupos de camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço;
- ✓ Não houve produção significativa de TNF nem de óxido nítrico por esplenócitos estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi* de camundongos vacinados e desafiados 4 ou 12 semanas após a dose de reforço em relação aos seus respectivos controles.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A descoberta de uma vacina contra as leishmanioses, especialmente a leishmaniose visceral, é um objetivo a ser atingido com importantes implicações para a saúde pública de vários países do Novo Mundo. A vacinação poderia beneficiar milhões de pessoas que habitam áreas endêmicas, pois, como citado anteriormente, a leishmaniose atinge grande parte das Américas, especialmente o Brasil, onde a leishmaniose visceral, especificamente, afeta populações rurais e urbanas, sendo fatal principalmente para crianças, desnutridos e imunocomprometidos (Fundação Nacional de Saúde, 2000).

A leishmaniose visceral ainda é pouco estudada no que diz respeito ao desenvolvimento de uma vacina segura, efetiva e que garanta proteção prolongada. A maioria dos testes com protocolos de vacinação contra a leishmaniose são feitos com a forma tegumentar (Mayrink e cols., 1979; Dumonteil e cols., 2002; Coelho e cols., 2003) ou com a leishmaniose visceral do Velho Mundo causada por *L. donovani* (Ahuja e cols, 1999; Melby e cols, 2001a; Stäger e cols., 2000; Ghosh e cols., 2001). Por isso, existe a necessidade de se iniciar um estudo mais efetivo com diferentes protocolos de vacinação contra *L. chagasi*, causadora de leishmaniose visceral no Novo Mundo.

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 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).

Esse trabalho visa principalmente o estudo dos aspectos imunológicos iniciais do desenvolvimento de uma vacina de DNA que codifica a proteína p36(LACK). Ela é uma proteína potencialmente imunogênica contra a leishmaniose causada por *L. chagasi*, já que se mostrou imunogênica e protetora em diversos protocolos de vacinação em

camundongos, principalmente contra uma espécie de *Leishmania* bastante estudada, a *L. major* (Gurunathan e cols., 1997; Gonzalo e cols., 2001; Gonzalo e cols., 2002). Vacinas genéticas codificando p36(LACK) também mostraram proteção contra infecção por *L. infantum* em cães (Ramiro e cols., 2003) e foram imunogênicas, mas não protegeram camundongos BALB/c contra infecções por *L. donovani* (Melby e cols., 2001a). É importante ressaltar que, nesses trabalhos, as vias de imunização foram intradérmica, subcutânea ou intra-peritoneal, não sendo utilizada a via intramuscular de administração da vacina.

Por esses motivos, foi escolhido um protocolo de vacinação que utiliza tanto a via de imunização subcutânea (vacina em solução salina) quanto a intramuscular (vacina com sacarose) para estudar os efeitos imunogênicos e a capacidade protetora contra *L. chagasi* de uma vacina de DNA que codifica a proteína p36(LACK).

Os resultados desse trabalho mostraram que esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo- p36(LACK) e não submetidos a desafio com promastigotas de *L. chagasi* são capazes de produzir IFN- γ após tratamento em cultura com diferentes estímulos, sejam eles frações antigênicas da própria *L. chagasi* ou a proteína p36(LACK) recombinante. Houve também pequena produção, mas significativa, dessa citocina por esplenócitos de camundongos inoculados com pCI-neo (Fig. 11), o que pode estar relacionado com a capacidade adjuvante do plasmídeo, propriedade já citada anteriormente. A falta de produção esplênica significativa de IL-4 (Fig. 12) associada à indução de produção de IFN- γ pelos esplenócitos mostram que a vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK) é capaz de induzir proliferação de clones de linfócitos responsivos à proteína p36(LACK) e de levar a uma resposta do tipo 1. Isso indica, portanto, que a proteína p36(LACK) foi expressa pelas células transfectadas e, após processada e apresentada por intermédio de sua ligação a moléculas de MHC I ou II, foi capaz de ser reconhecida por células T do sistema imunológico (Weiner & Kennedy, 1999). Esses resultados mostram que a vacina atende ao requisito de imunogenicidade correspondente à Fase I de pesquisa para o desenvolvimento de vacinas.

Por outro lado, notavelmente, o protocolo de vacinação utilizado não gerou os mesmos resultados quando a via subcutânea foi utilizada. Estudos feitos com vacina de DNA com o gen p36(LACK) utilizando-se a via subcutânea mostraram indução de IFN- γ pela vacina após estímulo de esplenócitos com antígeno solúvel ou com promastigotas vivas de *L. donovani* (Melby e cols., 2001a). A utilização da mesma via levou à produção de IFN- γ após estímulo de células de linfonodos com a proteína p36(LACK) e protegeu camundongos BALB/c contra infecção por *L. major* (Gurunathan e cols., 1997). Por outro lado, em nossos experimentos, utilizando-se a via subcutânea, não foi observada produção esplênica significativa de IFN- γ (Fig. 9) ou de IL-4 (Fig. 10) após estímulo com frações antigênicas de *L. chagasi* ou proteína p36(LACK) recombinante.

Esses resultados, em conjunto, sugerem, além da demonstração da capacidade imunogênica da vacina, um maior poder de estimulação resultante da vacinação intramuscular em relação ao da subcutânea. Como citado anteriormente, células musculares transfectadas se comportam como apresentadoras de antígeno e, mesmo não possuindo moléculas co-estimulatórias, conseguem processar a proteína LACK e apresentá-la ligada a moléculas de MHC I (Ulmer e cols., 1993). Esse complexo LACK-MHC I pode se ligar ao Receptor de Células T (TCR) de linfócitos citotóxicos que, sob o estímulo de citocinas Th1 produzidas por linfócitos T auxiliares e/ou citotóxicos previamente estimulados pela vacinação, podem se proliferar e se diferenciar em linfócitos T CD8 efetores ou de memória (Weiner & Kennedy, 1999). Além disso, os miócitos são capazes de realizar o “cross-priming” (ou apresentação cruzada), que resulta no estímulo e proliferação de linfócitos citotóxicos (Ulmer e cols., 1996). Essas propriedades das células musculares, além da transfecção direta das células dendríticas locais, podem estar garantindo os resultados obtidos pela via intramuscular de vacinação.

Apesar de queratinócitos e células dendríticas presentes no sítio de vacinação subcutânea também serem transfectados, e além dos primeiros apresentarem as mesmas propriedades acima descritas para as células musculares (Akbari e cols., 1999), é possível que um menor número dessas células tenham sido transfectadas pela vacinação subcutânea em relação ao número de células transfectadas no sítio de vacinação intramuscular,

resultando, assim, na estimulação de menor quantidade de linfócitos após vacinação pela primeira via. Essa diferença pode ter sido resultado da ação da sacarose, que pode ter aumentado o rendimento relativo ao número de células transfectadas no sítio intramuscular, pois a sacarose causa degeneração celular, facilitando a penetração do DNA no núcleo.

Alguns trabalhos utilizando a via subcutânea de vacinação e o gen LACK têm apresentado indução significativa de IFN- γ e/ou proteção contra diferentes tipos de *Leishmania*, diferentemente do que foi observado em nosso trabalho: vacinação com plasmídeo pcDNA-3 expressando uma versão reduzida da proteína LACK (aminoácidos 143-312) e administrado pela via subcutânea em solução salina (100 μ g/dose) induziu produção significativa de IFN- γ por células de linfonodos de camundongos BALB/c não infectados, após estímulo com proteína LACK (10 μ g/mL) e protegeu os camundongos contra infecção por *L. major* (Gurunathan e cols., 1997); a mesma versão reduzida, clonada no plasmídeo pcDNA3.1 e administrada na concentração de 50 μ g/dose pela via subcutânea conferiu proteção para camundongos C57BL/6 contra infecção por *L. major* (Méndez e cols., 2002) e vacinação com plasmídeo pcDNA-3.1 que codifica p36(LACK), administrado pela via subcutânea em solução salina (100 μ g/dose) induziu produção significativa de IFN- γ por esplenócitos e células do linfonodo de camundongos BALB/c não infectados, estimulados em cultura com promastigotas vivos ou antígeno solúvel de *L. donovani*, mas não protegeu os camundongos contra infecção com o mesmo parasito (Melby e cols., 2001a). Porém, algumas diferenças em relação ao nosso protocolo devem ser levadas em consideração. A utilização de diferentes plasmídeos e/ou diferentes doses, as diferenças quantitativas de proteína LACK entre as espécies de *Leishmania* utilizadas para preparação dos antígenos para estímulo em cultura, a proteína codificada pelo gen LACK (p36 ou versão p24), o órgão avaliado ou a linhagem do camundongo utilizado podem explicar as diferenças entre os resultados, no que diz respeito ao grau de proteção e de indução de produção de citocinas.

Nossos resultados também mostraram que a vacina, embora seja capaz de induzir IFN- γ , não leva à proteção camundongos desafiados pela via endovenosa 4 ou 12 semanas após a dose de reforço. Não houve diminuição de carga parasitária hepática ou esplênica de

camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) em relação a seus controles (inoculados com pCI-neo ou com PBS) (Figs. 13 e 14). É interessante notar, porém, que ao compararmos as cargas parasitárias esplênicas dos camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) ou inoculados com pCI-neo entre os diferentes tempos de desafio, observamos que camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço apresentaram menor número de parasitos por órgão (Fig. 13 - A x B). O mesmo ocorreu quando se compararam as cargas parasitárias hepáticas de camundongos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) e desafiados após 12 semanas versus os desafiados após 4 semanas (Fig. 14 - A x B).

Com relação ao padrão esplênico de citocinas observado, houve maior produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço em relação à de camundongos desafiados após 4 semanas tanto entre grupos vacinados com pCI-neo-p36(LACK) ou inoculados com PBS pela via subcutânea e estimulados em cultura quanto em todos os grupos nos quais foi utilizada a via intramuscular, submetidos ao mesmo estímulo (Fig. 15 - A x B). Não houve diferenças entre a produção esplênica de IL-4 após estímulo em cultura por esplenócitos de camundongos desafiados 4 semanas após a dose de reforço, se comparada com a dos desafiados após 12 semanas e submetidos ao mesmo estímulo, para ambas as vias utilizadas (Fig. 16).

Por sua vez, dados da literatura mostram que camundongos C57BL/6^J com idade entre 19 e 28 meses são mais susceptíveis a infecções com o parasito intestinal *Trichuris muris* do que camundongos da mesma linhagem com 3 meses de idade. A maior susceptibilidade dos camundongos mais velhos foi demonstrada pela elevada carga parasitária remanescente no ceco desses camundongos 35 dias após a infecção em relação à dos mais novos. Esse quadro foi acompanhado por uma maior produção de IFN- γ (Th1) e IL-12 e menor produção de IL-4 e IL-5 (Th2) por células de linfonodos dos camundongos mais velhos estimulados “in vitro” com ovos de *T. muris*. Isso está de acordo com o que se espera do quadro resultante do tipo de resposta imunológica montada contra infecções por helmintos em camundongos, onde a resposta Th1 está relacionada com a susceptibilidade e a Th2 com a resistência (Humphreys & Grencis, 2002). De acordo com essa observação, a

diferença de idade, mesmo não sendo tão grande, entre os camundongos desafiados 4 semanas após a dose de reforço (aproximadamente 4 meses de idade) e os desafiados após 12 semanas (aproximadamente 6 meses de idade) parece influenciar na polarização da resposta imunológica frente à infecção com *L. chagasi*.

Um dado importante a ser observado é a significativa produção de IL-4 por esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular e desafiados 12 semanas após a dose de reforço (o que não foi observado nos desafiados após 4 semanas) e estimulados em cultura em relação ao seu respectivo controle (sem estímulo em cultura) (Fig. 16 - B). Esse resultado, aliado à maior produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados de camundongos vacinados pela mesma via e desafiados 12 semanas após a dose de reforço e à menor carga parasitária esplênica e hepática desses animais, sugere a importância de IL-4, ao lado do IFN- γ , na resposta ao parasito. Tal fato contradiz o dogma Th1/Th2 estabelecido, principalmente, para as infecções por *L. major* em camundongos BALB/c. Esse papel da IL-4 pode ser evidenciado quando se bloqueia, em camundongos BALB/c susceptíveis, o receptor CTLA-4 (CD152), um homólogo de CD28 que pode funcionar como regulador negativo de ativação de linfócitos T (Chambers e cols., 2001). Esse bloqueio leva a um aumento na produção de IFN- γ e IL-4 por esplenócitos estimulados em cultura por antígeno recombinante de *L. chagasi* e resulta na quase completa eliminação da carga parasitária viável nos esplenócitos após 10 dias em cultura (Gomes e cols., 1998). Além disso, como citado anteriormente, camundongos deficientes em IL-4 ou IL-4 R α apresentam redução no nível sérico de IFN- γ , maior carga parasitária hepática e esplênica e atraso na maturação do granuloma hepático, o que mostra a importância de IL-4 e IL-13 na resposta de camundongos BALB/c contra infecção por *L. donovani* (Stäger e cols., 2003). Estudo feito com *Schistosoma mansoni* sugere que a ação de IL-4 como otimizador da atividade leishmanicida pode ser explicada pela ação regulatória da IL-4 na produção excessiva de óxido nítrico que, em altas concentrações, inibe a proliferação de células T nas infecções pelo helminto, prejudicando a produção de IFN- γ (Patton e cols., 2002). Em outro estudo envolvendo o tratamento de leishmaniose visceral, verificou-se, também, que camundongos BALB/c deficientes em IL-4 infectados

com *L. donovani* respondem mal ao tratamento com stibogluconato de sódio (maior carga parasitária em todos os tecidos examinados), o que está associado à redução dos níveis de transcritos de mRNA de IFN- γ e de IFN- γ sérico. Esses resultados demonstram o papel de IL-4 no tratamento da leishmaniose visceral, que parece estar relacionado com a modulação da produção de IFN- γ (Alexander e cols., 2000).

Quando se imunizam camundongos BALB/c ou C57BL/6 com proteína A2 (uma proteína estágio-específica de formas amastigotas de *L. donovani*), uma resposta mista Th1/Th2 está relacionada com a proteção contra infecção por *L. donovani* (Ghosh e cols., 2002). Em cães submetidos a vacinação heteróloga utilizando vacina de DNA e vetores recombinantes de vírus Vaccinia, ambos codificando a proteína p36(LACK), observa-se proteção contra desafio por *L. infantum*. Essa proteção se relaciona com a produção significativa de IFN- γ , IL-4 e de anticorpos IgG1 e IgG2 durante o curso de infecção, quadro característico de resposta mista Th1/Th2 (Ramiro e cols., 2003).

Nossos resultados mostraram, ainda, maior produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados de camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafiados 4 semanas após a dose de reforço em relação à de camundongos inoculados pela mesma via com pCI-neo e também desafiados após 4 semanas (Fig. 15 - A). O mesmo ocorreu nos camundongos desafiados 12 semanas após a dose de reforço, tanto em relação ao controle de animais inoculados com PBS quanto ao de inoculados com pCI-neo (Fig. 15 - B). Esses resultados mostram que a vacina de DNA pela via intramuscular induziu produção de IFN- γ esplênica após infecção, mantendo a memória imunológica por um tempo prolongado.

Essa memória imunológica deve-se à existência de células que exibem uma resposta aumentada e mais rápida frente a uma repetida exposição a um antígeno (Gray, 2001). Sua origem ainda é controversa. Existem evidências mostrando que elas podem ser geradas a partir de células efetoras (processo instrucional), o que não explica o porquê de células efetoras serem levadas à morte e células de memória serem mantidas vivas (Sprent & Tough, 2001). De acordo com outro ponto de vista, células de memória se originariam de linhagem diferente das células efetoras, o que não explica a quantidade constante de células

de memória (5 a 10%) em relação a qualquer pico de células geradas em uma resposta (Sourdive e cols., 1998).

Até cerca de 12 anos atrás, acreditava-se que as células de memória teriam a capacidade intrínseca de sobreviverem por longo tempo, necessitando de pouco ou nenhum estímulo externo. O melhor exemplo de sobrevivência antígeno-independente de células de memória é o caso de seis pessoas na Virgínia, Estados Unidos, que, 75 anos após um ataque de febre amarela, apresentavam anticorpos circulantes contra o vírus, que se imagina ser completamente eliminado pelo sistema imune (Mims, 1987). Por volta de 12-14 anos atrás, estudos indicaram a importância da persistência do antígeno para a sobrevivência das células de memória, o que tornou esse assunto bastante controverso.

Substâncias antigênicas são mantidas nos tecidos linfóides por muitos meses e possivelmente anos na forma de imuno-complexos na superfície de células dendríticas foliculares (Tew & Mandell, 1979). Quando células B de memória de camundongos normais são transferidas para camundongos deficientes em linfotóxina- α , que não possuem células dendríticas foliculares, esses animais falham na montagem de resposta prolongada por imunoglobulina G (Fu e cols., 2000). Esses dados reforçam a idéia da necessidade da presença de antígeno para manutenção da memória imunológica (Gray, 2001). Portanto, a capacidade de transfecção de células dendríticas pela vacina de DNA (Akbari e cols., 1999) pode explicar em parte a manutenção da memória imunológica observada em nosso trabalho.

Ao mesmo tempo, linfócitos T CD8⁺ têm um papel na manutenção de uma resposta prolongada após imunização com vacina de DNA, além de se mostrarem importantes na imunidade primária em infecções de camundongos BALB/c com *L. major*. Protocolo de vacinação utilizando DNA de p36(LACK), mas não proteínas de *Leishmania* associadas à IL-12, foi capaz de mostrar indução de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ e proteção prolongada contra infecção por *L. major* em camundongos BALB/c. Nesse mesmo modelo, a depleção de células T CD8⁺ no momento da infecção, além de levar à diminuição de frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , impediu a proteção induzida pela vacina, o que sugere, também, uma função imunorregulatória para as células T CD8⁺

(Gurunathan e cols., 2000c). Essa última função pode ser devida à regulação positiva da expressão de receptor de IL-12 (IL-12R) nos macrófagos e da ativação da transcrição de IL-12 pelo IFN- γ produzido pelos linfócitos T CD8⁺ (Szabo e cols., 1997), ao mesmo tempo que IL-12 regula positivamente seu próprio receptor (Hayes e cols., 1995) e aumenta a produção de IFN- γ por linfócitos T. Além disso, a vacina de DNA também induz produção de IFN- α (Sun e cols., 1998), citocina responsável pela geração de células T CD8⁺ de memória (Tough e cols., 1996) e pela regulação positiva da produção de IL-12 após infecção por *L. major* (Diefenbach e cols., 1998).

Além do estímulo resultante do reconhecimento do MHC I de células musculares associado à ação de citocinas, outra possível fonte de estímulo para linfócitos T CD8⁺ no processo de imunização com DNA é a apresentação cruzada de antígenos (“cross priming”). Como mencionado anteriormente, esse processo consiste na apresentação de antígenos exógenos associados a moléculas de MHC I. Células dendríticas locais podem realizar esse processo após a morte das células musculares transfectadas, garantindo, assim, tanto a manutenção de uma resposta por linfócitos T citotóxicos quanto o prolongamento dessa resposta mesmo quando a célula muscular pára de expressar o antígeno ou morre (Corr e cols., 1999; Donnelly e cols., 2000).

Levando-se em consideração o protocolo de imunização utilizado em nosso trabalho e a falta de proteção induzida pela vacina, alguns fatores devem ser observados, dentre eles: 1) os níveis de produção de IL-4 nos estágios iniciais e durante o percurso da infecção; 2) a via de infecção utilizada associada à alta carga de parasitos inoculados e 3) o nível de produção de IFN- γ induzida pela vacina. Esses fatores podem, de forma isolada ou associados, ter contribuído para a inefetividade da ação protetora da vacina.

Além do papel de IL-4 na leishmaniose visceral citado anteriormente, essa citocina apresenta uma dicotomia com relação ao tipo de resposta gerada após seu surgimento frente a infecções por parasitos do gênero *Leishmania*. Como mencionado anteriormente, sua rápida produção por células T CD4⁺ V β 4 V α 8 está relacionada com o forte fenótipo de susceptibilidade de camundongos BALB/c infectados com *L. major* (Launois e cols., 1997). Por outro lado, nesse mesmo modelo de infecção, quando presente nos momentos iniciais

após o desafio, IL-4 tem a capacidade de levar à diferenciação de células dendríticas imaturas em células produtoras de IL-12, favorecendo a montagem de uma resposta Th1 e a resistência. Já sua presença durante o período de ativação do linfócito T direciona a resposta para Th2, favorecendo o fenótipo de susceptibilidade (Biederman e cols., 2001). Nós não avaliamos a produção de IL-4 no baço inicialmente após a infecção. Mas, o fato da vacina ter-se mostrado indutora de resposta tipo 1 é suficiente para mostrar que, por influência ou não de IL-4 nos momentos iniciais após a infecção, o objetivo do direcionamento da resposta imunológica para Th1 foi alcançado. Seria interessante, porém, em trabalhos posteriores, avaliar se os níveis de produção de IL-4 atingidos teriam sido insuficientes para, ao lado do IFN- γ produzido, levar à diminuição da carga parasitária nos órgãos dos animais vacinados. A utilização da via intradérmica de infecção poderia ser uma maneira de se verificar isso. Hipoteticamente, devido à presença de maior quantidade de células da imunidade inata (granulócitos neutrófilos e mastócitos, por exemplo) no sítio de inoculação intradérmico que, quando infectadas ou em contato com o parasito, são capazes de produzir IL-4, a utilização dessa via poderia levar a uma maior produção de IL-4 após o desafio, o que auxiliaria uma resposta protetora.

Em estudos de desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral murina, os níveis de proteção atingidos são geralmente mais baixos em relação ao que se observa para a leishmaniose cutânea (Ulczak e cols., 1989; White e cols., 1990; Afrin & Ali, 1997; Stäger e cols., 2000; Ghosh e cols., 2001; Melby e cols., 2001a; Paraguai de Souza e cols., 2001). Isso pode ser devido à dificuldade de se conseguir visceralização em laboratório quando se empregam doses menores do parasito utilizando-se a via de desafio intradérmica, situação que se aproximaria melhor do que se observa em infecções naturais. O emprego da via intradérmica de desafio faria com que os parasitos se submetessem à resposta imunológica local e nos linfonodos, antes de atingirem as vísceras, o que não acontece quando se utiliza a via endovenosa. Isso teria implicações importantes no jogo de forças entre a resposta induzida pela vacina e o nível de carga parasitária. Experimentos de vacinação comparando desafios endovenosos utilizando-se baixas doses (1×10^4 promastigotas infectantes de *L. infantum* em final de fase logarítmica) com desafios intra-

dérmicos utilizando-se altas doses (1×10^7 promastigotas infectantes de *L. infantum* em final de fase logarítmica) indicaram que a via intradérmica de desafio resultou em níveis de proteção maiores no baço e no fígado de camundongos BALB/c se comparados com os da via endovenosa (Ahmed e cols., 2003). É importante ressaltar que, no trabalho citado, parasitos vivos e mortos foram separados por gradiente de Percoll, e os vivos foram utilizados nos desafios. Isso foi feito com o objetivo de se evitar a montagem de uma resposta imunológica contra os parasitos mortos, que atuaria sobre os parasitos como um todo, dificultando, assim, a infecção. Nós testamos esse protocolo com a *L. chagasi*, e não obtivemos resultados satisfatórios, ou seja, não houve visceralização (dados não mostrados). Com isso, nós pretendemos utilizar outros processos de separação de formas evolutivas de *Leishmania* como, por exemplo, o que utiliza gradiente de Ficoll para separação de formas metacíclicas (Späth & Beverley, 2001) e a utilização dessas formas em testes de infecção intradérmica, já que, na infecção natural, somente formas metacíclicas são inoculadas pelo inseto.

A possibilidade da produção de IFN- γ ter sido insuficiente para a proteção foi também fortemente levada em consideração, mesmo porque, como já citado anteriormente, as vacinas de DNA geralmente são menos potentes que outras vacinas, mesmo tendo o plasmídeo como um adjuvante intrínseco (Glück & Metcalfe, 1992), o que leva à necessidade da procura de adjuvantes adicionais ou de associações. A nossa intenção é a de associar a vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK) com a Leishvacin[®], que tem apresentado bons resultados na prevenção contra a leishmaniose cutânea (Mayrink e cols., 1979), e verificar sua capacidade de proteção frente ao desafio com *L. chagasi*. Nós imaginamos que, associando-se as propriedades de indução de resposta prolongada da vacina de DNA com o potencial de proteção da Leishvacin[®], possamos ter resultados satisfatórios tanto no que diz respeito à indução quanto à manutenção da proteção induzida pelas duas vacinas. Além disso, a despeito da ausência de proteção induzida pela vacina de DNA contra o desafio parasitário, é possível que a indução, por essa vacina, de resposta Th1 antígeno-específica contra a proteína LACK possa contribuir para a proteção gerada pela vacina multicomponente. Essa proteção poderia ser decorrente da produção local de IFN- γ

induzida pela vacina de DNA, que poderia tanto ativar macrófagos recentemente infectados quanto direcionar para Th1 a resposta montada contra os demais antígenos da outra vacina.

Portanto, mesmo sabendo que os estudos objetivando a obtenção de uma vacina segura, eficaz e de efeitos duradouros contra a leishmaniose visceral causada por *L. chagasi* ainda são precoces, entendemos que o fato de termos demonstrado a capacidade imunogênica da vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK) no modelo utilizado abre um espectro mais amplo para que possamos atingir esse objetivo. Outro aspecto importante a ser considerado foi a comprovação de que essa vacina preenche um requisito imprescindível para o seu bom funcionamento, ou seja, sua capacidade de induzir resposta prolongada. Com isso, a adequação de um protocolo eficiente para a visceralização da *L. chagasi* a partir de uma inoculação intradérmica, a melhor compreensão dos mecanismos imunológicos importantes para uma resposta protetora e a utilização de associações dessa vacina com outras vacinas conhecidas são possibilidades imediatas de continuidade desse estudo a partir dos resultados obtidos em nosso trabalho. Trabalhos posteriores considerando essas três possibilidades poderão gerar resultados mais consistentes no que diz respeito ao objetivo de se obter proteção contra o desafio por *L. chagasi*.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

A vacina de DNA pCI-neo-p36(LACK) administrada em camundongos BALB/c pela via intramuscular foi capaz de levar ao estímulo de linfócitos produtores de IFN- γ responsivos à proteína p36(LACK). No entanto, a produção dessa citocina induzida pela vacina não foi suficiente para proteger camundongos desafiados com altas doses do parasito (1×10^7 promastigotas de *L. chagasi*) pela via endovenosa.

Camundongos mais velhos (desafiados após um tempo mais prolongado - 12 semanas após a dose de reforço) apresentaram maior produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados em cultura em relação à de camundongos mais novos (desafiados 4 semanas após a dose de reforço), o que sugere uma relação diretamente proporcional entre a idade e a intensidade de resposta do tipo 1 em camundongos BALB/c.

A produção significativa de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular e desafiados com *L. chagasi*, estimulados com antígeno particulado do parasito, em relação à dos esplenócitos de camundongos inoculados com pCI-neo (desafiados 4 semanas após a dose de reforço) ou inoculados com pCI-neo ou PBS (desafiados 12 semanas após a dose de reforço), e também estimulados, mostra que a vacinação intramuscular com DNA pCI-neo-p36(LACK) é capaz de gerar uma resposta prolongada contra o desafio por *L. chagasi*.

A produção significativa de IL-4 por esplenócitos de camundongos vacinados pela via intramuscular com pCI-neo-p36(LACK) e desafiados 12 semanas após a dose de reforço, estimulados com antígeno particulado de *L. chagasi*, em relação ao grupo controle (sem estímulo), aliada à maior produção de IFN- γ esplênica e à menor carga parasitária hepática e esplênica desses camundongos em relação às dos desafiados após 4 semanas, sugere a participação da citocina IL-4 na resposta protetora contra infecção por *L. chagasi*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRIN F. & ALI N. (1997) Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect.Immun.* **65**, 2371-2377.
- AGA E., KATSCHINSKI D.M., VAN ZANDBERGEN G., LAUFS H., HANSEN B., MULLER K., SOLBACH W. & LASKAY T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J.Immunol.* **169**, 898-905.
- AGUILAR C.M., FERNANDEZ E., FERNANDEZ R., CANNOVA D.C., FERRER E., CABRERA Z., SOUZA W.J. & COUTINHO S.G. (1998) Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **93**, 15-16.
- AHMED S., COLMENARES M., SOONG L., GOLDSMITH-PESTANA K., MUNSTERMANN L., MOLINA R. & MCMAHON-PRATT D. (2003) Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect.Immun.* **71**, 401-410.
- AHUJA S.S., REDDICK R.L., SATO N., MONTALBO E., KOSTECKI V., ZHAO W., DOLAN M.J., MELBY P.C. & AHUJA S.K. (1999) Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J.Immunol.* **163**, 3890-3897.
- AKBARI O., PANJWANI N., GARCIA S., TASCÓN R., LOWRIE D. & STOCKINGER B. (1999) DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J.Exp.Med.* **189**, 169-178.
- ALEXANDER J., CARTER K.C., AL FASI N., SATOSKAR A. & BROMBACHER F. (2000) Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur.J.Immunol.* **30**, 2935-2943.
- ANSTEAD G.M., CHANDRASEKAR B., ZHAO W., YANG J., PEREZ L.E. & MELBY P.C. (2001) Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect.Immun.* **69**, 4709-4718.
- ASEFFA A., GUMY A., LAUNOIS P., MACDONALD H.R., LOUIS J.A. & TACCHINI-COTTIER F. (2002) The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J.Immunol.* **169**, 3232-3241.
- ASHFORD R.W. (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin.Dermatol.* **14**, 523-532.

- ASHFORD R.W. (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int.J. Parasitol.* **30**, 1269-1281.
- ATO M., STAGER S., ENGWERDA C.R. & KAYE P.M. (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat.Immunol.* **3**, 1185-1191.
- BADARO R., JONES T.C., LORENÇO R., CERF, B.J., SAMPAIO D., CARVALHO E.M., ROCHA H., TEIXEIRA R. & JOHNSON W.D., Jr. (1986a) A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J.Infect.Dis.* **154**, 639-649.
- BADARO R., JONES T.C., CARVALHO E.M., SAMPAIO D., REED S.G., BARRAL A., TEIXEIRA R. & JOHNSON W.D., Jr. (1986b) New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J.Infect.Dis.* **154**, 1003-1011.
- BADOLATO R., SACKS D.L., SAVOIA D. & MUSSO T. (1996) *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp.Parasitol.* **82**, 21-26.
- BELKAID Y., PICCIRILLO C.A., MENDEZ S., SHEVACH E.M. & SACKS D.L. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**, 502-507.
- BELKAID Y. (2003) The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **3**, 875-885.
- BERMUDEZ-HUMARAN L.G., LANGELLA P., CORTES-PEREZ N.G., GRUSS A., TAMEZ-GUERRA R.S., OLIVEIRA S.C., SAUCEDO-CARDENAS O., MONTES D.O.-L. & LE LOIR Y. (2003) Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect.Immun.* **71**, 1887-1896.
- BERZOFKY J.A., AHLERS J.D. & BELYAKOV I.M. (2001) Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 209-219.
- BIEDERMANN T., ZIMMERMANN S., HIMMELRICH H., GUMY A., EGETER O., SAKRAUSKI A.K., SEEGMULLER I., VOIGT H., LAUNOIS P., LEVINE A.D., WAGNER H., HEEG K., LOUIS J.A. & ROCKEN M. (2001) IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat.Immunol.* **2**, 1054-1060.
- BOURREAU E., PREVOT G., GARDON J., PRADINAUD R., HASAGEWA H., MILON G. & LAUNOIS P. (2002a) LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma

interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect.Immun.* 312-3129

- BOURREAU E., COLLET M., PREVOT G., MILON G., ASHIMOFF D., HASAGEWA H., PARRA-LOPEZ C. & LAUNOIS P. (2002b) IFN-gamma-producing CD45RA+CD8+ and IL-10-producing CD45RA-CD4+ T cells generated in response to LACK in naive subjects never exposed to *Leishmania*. *Eur.J.Immunol.* **32**, 510-520.
- BOURREAU E., PASCALIS H., PREVOT G., KARIMINIA A., JOLLY N., MILON G., BUFFET P., MICHEL R., MEYNARD J.B., BOUTIN J.P., ASCHIMOFF D. & LAUNOIS P. (2003) Increased production of interferon-gamma by *Leishmania* homologue of the mammalian receptor for activated C kinase-reactive CD4+ T cells among human blood mononuclear cells: an early marker of exposure to *Leishmania*? *Scand.J.Immunol.* **58**, 201-210.
- BOYER R.F. (1993) Modern experimental biochemistry. 2nd ed. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.*
- BRAMSON J.L., DAYBALL K., HALL J.R., MILLAR J.B., MILLER M., WAN Y.H., LIN R. & HISCOTT J. (2003) Super-activated interferon-regulatory factors can enhance plasmid immunization. *Vaccine* **21**, 1363-1370.
- BRITTINGHAM A. & MOSSER D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol.Today* **12**, 444-447.
- CALDAS A.J., SILVA D.R., PEREIRA C.C., NUNES P.M., SILVA B.P., SILVA A.A., BARRAL A. & COSTA J.M. (2001) *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in children from an endemic area of visceral leishmaniasis in the Sao Luis Island-MA, Brazil. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **34**, 445-451.
- CARVALHO E.M., TEIXEIRA R.S. & JOHNSON W.D., Jr. (1981) Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect.Immun.* **33**, 498-500.
- CASADEVALL A. & PIROFSKI L.A. (2003) Exploiting the redundancy in the immune system: vaccines can mediate protection by eliciting 'unnatural' immunity. *J.Exp.Med.* **197**, 1401-1404.
- CASTRO-SOUSA F., PARANHOS-SILVA M., SHERLOCK I., PAIXAO M.S., PONTES-DE-CARVALHO L.C. & DOS-SANTOS W.L. (2001) Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 997-999.

- CHAKOUR R., GULER R., BUGNON M., ALLENBACH C., GARCIA I., MAUEL J., LOUIS J. & TACCHINI-COTTIER F. (2003) Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. *Infect.Immun.* **71**, 5287-5295.
- CHAMBERS C.A., KUHN M.S., EGEN J.G. & ALLISON J.P. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu.Rev.Immunol.* **19**, 565-594.
- CHATELAIN R., VARKILA K. & COFFMAN R.L. (1992) IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J.Immunol.* **148**, 1182-1187.
- CHATELAIN R., MAUZE S. & COFFMAN R.L. (1999) Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* **21**, 211-218.
- CHU R.S., TARGONI O.S., KRIEG A.M., LEHMANN P.V. & HARDING C.V. (1997) CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J.Exp.Med.* **186**, 1623-1631.
- 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.* **71**, 3988-3994.
- CONVIT J., PINARDI M.E. & RONDÓN A.J. (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **66**, 603-610.
- CORR M., VON DAMM A., LEE D.J. & TIGHE H. (1999) *In vivo* priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J.Immunol.* **163**, 4721-4727.
- CUNHA S., FREIRE M., EULALIO C., CRISTOVAO J., NETTO E., JOHNSON W.D., Jr., REED S.G. & BADARO R. (1995) Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **89**, 155-158.
- CUPOLILLO E., MEDINA-ACOSTA E., NOYES H., MOMEN H. & GRIMALDI G., Jr. (2000) A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol.Today* **16**, 142-144.

- DATTA N., MUKHERJEE S., DAS L. & DAS P.K. (2003) Targeting of immunostimulatory DNA cures experimental visceral leishmaniasis through nitric oxide up-regulation and T cell activation. *Eur.J.Immunol.* **33**, 1508-1518.
- DE ALMEIDA M.C., CARDOSO S.A. & BARRAL-NETTO M. (2003) *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int.J.Parasitol.* **33**, 153-162.
- DELGADO O., FELICIANGELI M.D., GOMEZ B., ALVARADO J., GARCIA L. & BELLO C. (1998) The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela: present situation of human and canine infections. *Parasite* **5**, 317-323.
- DIEFENBACH A., SCHINDLER H., DONHAUSER N., LORENZ E., LASKAY T., MACMICKING J., ROLLINGHOFF M., GRESSER I. & BOGDAN C. (1998) Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity.* **8**, 77-87.
- DOMINGUEZ M., MORENO I., AIZPURUA C. & TORANO A. (2003) Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes.Infect.* **5**, 507-513.
- DONNELLY J.J., ULMER J.B., SHIVER J.W. & LIU M.A. (1997) DNA vaccines. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 617-648.
- DONNELLY J.J., LIU M.A. & ULMER J.B. (2000) Antigen presentation and DNA vaccines. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **162**, S190-S193.
- DOWNES E.A. (1972) Quantitative problems in biochemistry. 5nd ed. Ed. Churchill Livingstone.
- DUMONTEIL E., MARIA JESUS R.S., JAVIER E.O. & MARIA DEL ROSARIO G.M. (2003) DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* **21**, 2170-2177.
- EIDSMO L., WOLDAY D., BERHE N., SABRI F., SATTI I., EL HASSAN A.M., SUNDAR S., CHIODI F. & AKUFFO H. (2002) Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. *Clin.Exp.Immunol.* **130**, 307-313.
- ENGWERDA C.R. & KAYE P.M. (2000) Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol.Today* **21**, 73-78.

- FACHADO A., RODRIGUEZ A., ANGEL S.O., PINTO D.C., VILA I., ACOSTA A., AMENDOEIRA R.R. & LANNES-VIEIRA J. (2003) Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. *Vaccine* **21**, 1327-1335.
- FANTUZZI L., PUDDU P., VARANO B., DEL CORNO M., BELARDELLI F. & GESSANI S. (2000) IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **68**, 707-714.
- FEARON D.T. & LOCKSLEY R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-53.
- FERNÁNDEZ-GUERRERO M.L., ROBLES P., RIVAS P., MÓJER F., MUÑIZ G. & DE GÓRGOLAS M. (2003) Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop.*
- FERRO C., MORRISON A.C., TORRES M., PARDO R., WILSON M.L. & TESH R.B. (1995) Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: *Psychodidae*) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J.Med.Entomol.* **32**, 527-537.
- FRANCA-SILVA J.C., DA COSTA R.T., SIQUEIRA A.M., MACHADO-COELHO G.L., DA COSTA C.A., MAYRINK W., VIEIRA E.P., COSTA J.S., GENARO O. & NASCIMENTO E. (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet.Parasitol.* **111**, 161-173.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (2000) Guia de vigilância epidemiológica. <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0517A.htm>
- FU Y.X., HUANG G., WANG Y. & CHAPLIN D.D. (2000) Lymphotoxin-alpha-dependent spleen microenvironment supports the generation of memory B cells and is required for their subsequent antigen-induced activation. *J.Immunol.* **164**, 2508-2514.
- GANTT K.R., GOLDMAN T.L., MCCORMICK M.L., MILLER M.A., JERONIMO S.M., NASCIMENTO E.T., BRITIGAN B.E. & WILSON M.E. (2001) Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J.Immunol.* **167**, 893-901.

- GHOSH A., LABRECQUE S. & MATLASHEWSKI G. (2001) Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine* **19**, 3169-3178.
- GHOSH A., ZHANG W.W. & MATLASHEWSKI G. (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* **20**, 59-66.
- GHOSH S., BHATTACHARYYA S., SIRKAR M., SA G.S., DAS T., MAJUMDAR D., ROY S. & MAJUMDAR S. (2002) *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infect.Immun.* **70**, 6828-6838.
- GLUCK R. & METCALFE I.C. (2002) New technology platforms in the development of vaccines for the future. *Vaccine* **20 Suppl 5**, B10-B16
- GOMES N.A., BARRETO-DE-SOUZA V., WILSON M.E. & DOSREIS G.A. (1998) Unresponsive CD4+ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *J.Infect.Dis.* **178**, 1847-1851.
- GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G., TALADRIZ S., MARQUET A. & LARRAGA V. (1999) Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* **259**, 909-916.
- GONZALO R.M., RODRIGUEZ J.R., RODRIGUEZ D., GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G., LARRAGA V. & ESTEBAN M. (2001) Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and infection* **3**, 701-711.
- GONZALO R.M., DEL REAL G., RODRIGUEZ J.R., RODRIGUEZ D., HELJASVAARA R., LUCAS P., LARRAGA V. & ESTEBAN M. (2002) A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 1226-1231.
- GRAY D. (2002) A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 60-65.
- GREEN L.C., WAGNER D.A., GLOGOWSKI J., SKIPPER P.L., WISHNOK J.S. & TANNENBAUM S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵Nnitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* **126** , 131-138.

- GREGORIADIS G., BACON A., CAPARROS-WANDERLEY W. & MCCORMACK B. (2002) A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* **20 Suppl 5**, B1-B9.
- GRIMALDI G.Jr. & TESH R.B. (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clin.Microbiol.Rev.* **6**, 230-250.
- GURUNATHAN S., SACKS D.L., BROWN D.R., REINER S.L., CHAREST H., GLAICHENHAUS N. & SEDER R.A. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.* **186**, 1137-1147.
- GURUNATHAN S., KLINMAN D.M. & SEDER R.A. (2000a) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 927-974.
- GURUNATHAN S., WU C.Y., FREIDAG B.L. & SEDER R.A. (2000b) DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **12**, 442-447.
- GURUNATHAN S., STOBIE L., PRUSSIN C., SACKS D.L., GLAICHENHAUS N., IWASAKI A., FOWELL D.J., LOCKSLEY R.M., CHANG J.T., WU C.Y. & SEDER R.A. (2000c) Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J.Immunol.* **165**, 915-924.
- HANDMAN E. & BULLEN D.V. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* **18**, 332-334.
- HAYES M.P., WANG J. & NORCROSS M.A. (1995) Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* **86**, 646-650.
- HOFMAN V., BROUSSET P., MOUGNEAU E., MARTY P., LAMANT L., ANTOINE J.C., GLAICHENHAUS N. & HOFMAN P. (2003) Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (19-11) to the Leishmania homologue of receptors for activated C-kinase. *Am.J.Clin.Pathol.* **120**, 567-574.
- HONG W., XIAO S., ZHOU R., FANG L., HE Q., WU B., ZHOU F. & CHEN H. (2002) Protection induced by intramuscular immunization with DNA vaccines of pseudorabies in mice, rabbits and piglets. *Vaccine* 1205-1214.
- HOUDE M., BERTHOLET S., GAGNON E., BRUNET S., GOYETTE G., LAPLANTE A., PRINCIOTTA M.F., THIBAUT P., SACKS D. & DESJARDINS M. (2003)

- Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406.
- HUMPHREYS N.E. & GRENCIS R.K. (2002) Effects of ageing on the immunoregulation of parasitic infection. *Infect.Immun.* 5148-5157.
- HUYGEN K. (2003) On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect.Immun.* **71**, 1613-1621.
- IQBAL M., LIN W., JABBAL-GILL I., DAVIS S.S., STEWARD M.W. & ILLUM L. (2003) Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine* **21**, 1478-1485.
- JULIA V., MCSORLEY S.S., MALHERBE L., BREITTMAYER J.P., GIRARD-PIPAU F., BECK A. & GLAICHENHAUS N. (2000) Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J.Immunol.* **165**, 5637-5645.
- JULIA V. & GLAICHENHAUS N. (1999) CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect.Immun.* **67**, 3641-3644.
- KARPLUS T.M., JERONIMO S.M., CHANG H., HELMS B.K., BURNS T.L., MURRAY J.C., MITCHELL A.A., PUGH E.W., BRAZ R.F., BEZERRA F.L. & WILSON M.E. (2002) Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect.Immun.* 6919-6925.
- KAYE P.M., CURRY A.J. & BLACKWELL J.M. (1991) Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J.Immunol.* **146**, 2763-2770.
- KLINMAN D.M., YI A.K., BEAUCAGE S.L., CONOVER J. & KRIEG A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 2879-2883.
- LAINSON R. & SHAW J.J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. *The leishmaniasis*, Academic Press Inc., London 1-20.
- LAINSON R. & SHAW J.J. (1988) Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann.Parasitol.Hum.Comp* **63**, 134-145.

- LAINSON R. & SHAW J.J. (1992) A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: *Kinetoplastida*) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* **44**, 94-106.
- LASKAY T., VAN ZANDBERGEN G. & SOLBACH W. (2003) Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* **11**, 210-214.
- LATTIME E.C., STOPPACCIARO A. & STUTMAN O. (1988) Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *J.Immunol.* **141**, 3422-3428.
- LAUNOIS P., MAILLARD I., PINGEL S., SWIHART K.G., XENARIOS I., ACHARORBEA H., DIGGELMANN H., LOCKSLEY R.M., MACDONALD H.R. & LOUIS J.A. (1997) IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* **6**, 541-549.
- LAUNOIS P., HIMMELRICH H., TACCHINI-COTTIER F., MILON G. & LOUIS J.A. (1999) New insight into the mechanisms underlying Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Microbes.Infect.* **1**, 59-64.
- LE BON A., ETCHART N., ROSSMANN C., ASHTON M., HOU S., GEWERT D., BORROW P. & TOUGH D.F. (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat.Immunol.* **4**, 1009-1015.
- LEZAMA-DÁVILA C.M. (1999) Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis. Use of purified gp63 encapsulated into niosomes surfactants vesicles: a novel approach. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94**, 67-70.
- LO S.K., BOVIS L., MATURA R., ZHU B., HE S., LUM H., TURCO S.J. & HO J.L. (1998) *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J.Immunol.* **160**, 1857-1865.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- MA X., CHOW J.M., GRI G., CARRA G., GEROSA F., WOLF S.F., DZIALO R. & TRINCHIERI G. (1996) The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J.Exp.Med.* **183**, 147-157.
- MAASHO K., SATTI I., NYLEN S., GUZMAN G., KONING F. & AKUFFO H. (2000) A *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors. *J.Infect.Dis.* **182**, 570-578.

- MARY C., AURIAULT V., FAUGERE B. & DESSEIN A.J. (1999) Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect.Immun.* **67**, 5559-5566.
- MATSUI M., MORIYA O. & AKATSUKA T. (2003) Enhanced induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes and protective efficacy in mice by DNA vaccination followed by adenovirus boosting in combination with the interleukin-12 expression plasmid. *Vaccine* **21**, 1629-1639.
- MATTNER F., ALBER G., MAGRAM J. & KOPF M. (1997) The role of IL-12 and IL-4 in *Leishmania major* infection. *Chem.Immunol.* **68**, 86-109.
- MAURICIO I.L., HOWARD M.K., STOTHARD J.R. & MILES M.A. (1999) Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* **119** (Pt 3), 237-246.
- MAURICIO I.L., STOTHARD J.R. & MILES M.A. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol.Today* **16**, 188-189.
- MAYRINK W., DA COSTA C.A., MAGALHAES P.A., MELO M.N., DIAS M., LIMA A.O., MICHALICK M.S. & WILLIAMS P. (1979) A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **73**, 385-387.
- MEDZHITOV R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 135-145.
- MELBY P.C., YANG Y.Z., CHENG J. & ZHAO W. (1998) Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect.Immun.* 18-27.
- MELBY P.C., YANG J., ZHAO W., PEREZ L.E. & CHENG J. (2001a) *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect.Immun.* 4719-4725.
- MELBY P.C., TABARES A., RESTREPO B.I., CARDONA A.E., MCGUFF H.S. & TEALE J.M. (2001b) *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp.Parasitol.* 17-25.
- MELBY P.C., CHANDRASEKAR B., ZHAO W. & COE J.E. (2001c) The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J.Immunol.* **166**, 1912-1920.

- MÉNDEZ S., BELKAID Y., SEDER R.A. & SACKS D. (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**, 3702-3708.
- MÉNDEZ S., TABBARA K., BELKAID Y., BERTHOLET S., VERTHELYI D., KLINMAN D., SEDER R.A. & SACKS D.L. (2003) Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect.Immun.* **71**, 5121-5129.
- MIMS C.A. (1987) Pathogenesis of infectious disease. 3rd ed. *Academic, London*.
- MOSSALAYI M.D., AROCK M., MAZIER D., VINCENDEAU P. & VOULDOUKIS I. (1999) The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol.Today* **15**, 342-345.
- MOUGNEAU E., ALTARE F., WAKIL A.E., ZHENG S., COPPOLA T., WANG Z.E., WALDMANN R., LOCKSLEY R.M. & GLAICHENHAUS N. (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* **268**, 563-566.
- MURRAY H.W., MASUR H. & KEITHLY J.S. (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *J.Immunol.* **129**, 344-350.
- MURRAY H.W. & NATHAN C.F. (1999) Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J.Exp.Med.* **189**, 741-746.
- NASCIMENTO M.D., COSTA J.M., FIORI B.I., VIANA G.M., FILHO M.S., ALVIM A.C., BASTOS O.C., NAKATANI M., REED S., BADARO R., DA SILVA A.R. & BURATTINI M.N. (1996) The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **29**, 233-240.
- NASHLEANAS M., KANALY S. & SCOTT P. (1998) Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J.Immunol.* **160**, 5506-5513.
- NEVES D.P. (2002) Parasitologia humana. 10^a ed. *Ed. Atheneu* pp.31-72.
- OLIVEIRA C.D., ASSUNCAO R.M., REIS I.A. & PROIETTI F.A. (2001) Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad.Saude Publica* **17**, 1231-1239.

- ORAN A.E. & ROBINSON H.L. (2003) DNA vaccines, combining form of antigen and method of delivery to raise a spectrum of IFN-gamma and IL-4-producing CD4+ and CD8+ T cells. *J.Immunol.* **171**, 1999-2005.
- PADIGEL U.M., ALEXANDER J. & FARRELL J.P. (2003) The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J.Immunol.* **171**, 3705-3710.
- PARAGUAI D.S., BERNARDO R.R., PALATNIK M. & PALATNIK DE SOUSA C.B. (2001) Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine* **19**, 3104-3115.
- PATTON E.A., LA FLAMME A.C., PEDRAS-VASONCELOS J.A. & PEARCE E.J. (2002) Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. *Infect.Immun.* **70**, 177-184.
- PEREIRA M.G. (1995) Epidemiologia - teoria e prática. Ed. Guanabara Koogan p.316.
- PROFETA DA LUZ Z.M., PIMENTA D.N., CABRAL A.L., FIUZA V.O. & RABELLO A. (2001) Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **34**, 249-254.
- PROMEGA (1996) pCI-neo mammalian expression vector. <http://www.promega.com/tbs/tb215/tb215.html#iiid>
- RAMIRO M.J., ZARATE J.J., HANKE T., RODRIGUEZ D., RODRIGUEZ J.R., ESTEBAN M., LUCIENTES J., CASTILLO J.A. & LARRAGA V. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**, 2474-2484.
- RASO P. & GENARO O. (1994) Patologia das principais doenças tropicais no Brasil – Leishmaniose Tegumentar Americana. In *Bogliolo Patologia*. 5ª Ed. Eds. G.B. Filho, J.E.H. Pittela, F.E.L. Pereira, E.A. Bambirra & A.J.A. Barbosa. Rio de Janeiro: pp. 1145-1150.
- RAY M., GAM A.A., BOYKINS R.A. & KENNEY R.T. (2000) Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J.Infect.Dis.* **181**, 1121-1128.
- READY P. (2000) Sand fly evolution and its relationship to *Leishmania* transmission. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **95**, 589-590.
- REINER N.E., NG W. & MCMASTER W.R. (1987) Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression

- of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J.Immunol.* **138**, 1926-1932.
- RHEE E.G., MENDEZ S., SHAH J.A., WU C.Y., KIRMAN J.R., TURON T.N., DAVEY D.F., DAVIS H., KLINMAN D.M., COLER R.N., SACKS D.L. & SEDER R.A. (2002) Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J.Exp.Med.* **195**, 1565-1573.
- RITTIG M.G. & BOGDAN C. (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol.Today* **16**, 292-297.
- ROGERS K.A. & TITUS R.G. (2003) Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite Immunol.* **25**, 127-134.
- RYAN L., LAINSON R. & SHAW J.J. (1987) Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: *Psychodidae*) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania (braziliensis) braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans.R.Trop.Med.Hyg.* **81**, 353-359.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. & MANIATIS T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press (NY-USA)* PE.5.
- SAMPAIO I.B.M. (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. 2^a ed. *Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - UFMG* pp.1-221.
- SANTOS J.B., LAUAND L., SOUZA G.S. & MACEDO V.O. (2000) Socioeconomic factors and attitudes towards household prevention of American cutaneous leishmaniasis in an endemic area in Southern Bahia, Brazil. *Cad.Saude Publica* **16**, 701-708.
- SANTOS W.R., AGUIAR I.A., PARAGUAI d.S., DE LIMA V.M., PALATNIK M. & PALATNIK-DE-SOUSA C.B. (2003) Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* **21**, 4668-4676.
- SCHILLING S. & GLAICHENHAUS N. (2001) T cells that react to the immunodominant *Leishmania major* LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. *Infect.Immun.* **69**, 1212-1214.
- SCHOENBERGER S.P., VAN DER VOORT E.I., KRIETEMEIJER G.M., OFFRINGA R., MELIEF C.J. & TOES R.E. (1998) Cross-priming of CTL responses *in vivo*

- does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J.Immunol.* **161**, 3808-3812.
- SCOTT P., NATOVITZ P., COFFMAN R.L., PEARCE E. & SHER A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.* **168**, 1675-1684.
- SCOTT P. (1991) IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.* **147**, 3149-3155.
- SHAH J.A., DARRAH P.A., AMBROZAK D.R., TURON T.N., MENDEZ S., KIRMAN J., WU C.Y., GLAICHENHAUS N. & SEDER R.A. (2003) Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.* **198**, 281-291.
- SIELING P.A., WANG X.H., GATELY M.K., OLIVEROS J.L., MCHUGH T., BARNES P.F., WOLF S.F., GOLKAR L., YAMAMURA M., YOGI Y., UYEMURA K., REA T. H. & MODLIN, R.L. (1994) IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J.Immunol.* **153**, 3639-3647.
- SILVA A.C. & GOMES A.C. (2001) Study of the vectorial competence of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) for *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **34**, 187-191.
- SILVA E.S., GONTIJO C.M., PACHECO R.S., FIUZA V.O. & BRAZIL R.P. (2001) Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 285-291.
- SOURDIVE D.J., MURALI-KRISHNA K., ALTMAN J.D., ZAJAC A.J., WHITMIRE J.K., PANNETIER C., KOURILSKY P., EVAVOLD B., SETTE A. & AHMED R. (1998) Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J.Exp.Med.* **188**, 71-82.
- SOUTHGATE B.A. & MANSON-BAHR P.E. (1967) Studies in the epidemiology of East African leishmaniasis. 4. The significance of the positive leishmanin test. *J.Trop.Med.Hyg.* **70**, 29-33.
- SPÄTH G.F. & BEVERLEY S.M. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.* **99**, 97-103.

- SPÄTH G.F., GARRAWAY L.A., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. (2003) The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 9536-9541.
- SPRENT J. & TOUGH D.F. (2001) T cell death and memory. *Science* **293**, 245-248.
- STÄGER S., SMITH D.F. & KAYE P.M. (2000) Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J.Immunol.* **165**, 7064-7071.
- STÄGER S., ALEXANDER J., CARTER K.C., BROMBACHER F. & KAYE P.M. (2003) Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect.Immun.* **71**, 4804-4807.
- STERN J.J., OCA M.J., RUBIN B.Y., ANDERSON S.L. & MURRAY H.W. (1988) Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *J.Immunol.* **140**, 3971-3977.
- STOBIE L., GURUNATHAN S., PRUSSIN C., SACKS D.L., GLAICHENHAUS N., WU C.Y. & SEDER R.A. (2000) The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells *in vivo*: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 8427-8432.
- SUAREZ D.L. & SCHULTZ-CHERRY S. (2000) The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model. *Avian Dis.* **44**, 861-868.
- SUKUMARAN B., TEWARY P., SAXENA S. & MADHUBALA R. (2003) Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine* **21**, 1292-1299.
- SUN S., ZHANG X., TOUGH D.F. & SPRENT J. (1998) Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J.Exp.Med.* **188**, 2335-2342.
- SZABO S.J., DIGHE A.S., GUBLER U. & MURPHY K.M. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J.Exp.Med.* **185**, 817-824.
- TEW J.G. & MANDEL T.E. (1979) Prolonged antigen half-life in the lymphoid follicles of specifically immunized mice. *Immunology* **37**, 69-76.

- TITUS R.G., MARCHAND M., BOON T. & LOUIS J.A. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* **7**, 545-555.
- TOLEDO V.P., MAYRINK W., GOLLOB K.J., OLIVEIRA M.A., COSTA C.A., GENARO O., PINTO J.A. & AFONSO L.C. (2001) Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 89-98.
- TOUGH D.F., BORROW P. & SPRENT J. (1996) Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*. *Science* **272**, 1947-1950.
- TRAVI B.L., OSORIO Y., BECERRA M.T. & ADLER G.H. (1998) Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **92**, 275-278.
- ULCZAK O.M., GHADIRIAN E., SKAMENE E., BLACKWELL J.M. & KONGSHAVN P.A. (1989) Characterization of protective T cells in the acquired response to *Leishmania donovani* in genetically determined cure (H-2b) and noncure (H-2d) mouse strains. *Infect.Immun.* **57**, 2892-2899.
- ULMER J.B., DONNELLY J.J., PARKER S.E., RHODES G.H., FELGNER P.L., DWARKI V.J., GROMKOWSKI S.H., DECK R.R., DEWITT C.M., FRIEDMAN A., HAWE L.A., LEANDER K.R., MARTINEZ D., PERRY H.C., SHIVER J.W., MONTGOMERY D.L. & LIU M.A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745-1749.
- ULMER J.B., DECK R.R., DEWITT C.M., DONNHLY J.I. & LIU M.A. (1996) Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* **89**, 59-67.
- VAN ZANDBERGEN G., HERMANN N., LAUFS H., SOLBACH W. & LASKAY T. (2002) *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect.Immun.* 4177-4184.
- VIEIRA J.B. & COELHO G.E. (1998) Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **31 Suppl 2**, 85-92.
- WATSON J.D., GILMAN M., WITKOWSKI J. & ZOLLER M. (1997) O DNA recombinante. Tradução coordenada por Élio Hideo Babá - Ouro Preto, MG. 2ª ed. *Ed. UFOP* p.24.

- WEERATNA R.D., MCCLUSKIE M.J., XU Y. & DAVIS H.L. (2000) CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* **18**, 1755-1762.
- WEINER D.B. & KENNEDY R.C. (1999) Genetic vaccines. *Sci.Am.* **281**, 50-57.
- WELBURN S.C. & MURPHY N.B. (1998) Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in *Trypanosomes* induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell Death.Differ.* **5**, 615-622.
- WERLING D. & JUNGI T.W. (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **91**, 1-12.
- WERNECK G.L., RODRIGUES L., SANTOS M.V., ARAUJO I.B., MOURA L.S., LIMA S.S., GOMES R.B., MAGUIRE J.H. & COSTA C.H. (2002) The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* **83**, 13-18.
- WHITE A.C., Jr. & MCMAHON-PRATT D. (1990) Prophylactic immunization against experimental *Leishmania donovani* infection by use of a purified protein vaccine. *J.Infect.Dis.* **161**, 1313-1314.
- 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.* **156**, 2231-2239.
- WILSON M.E. & WEINSTOCK J.V. (1996) Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Methods* **9**, 248-254.
- WILSON M.E., YOUNG B.M., DAVIDSON B.L., MENTE K.A. & MCGOWAN S.E. (1998) The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J.Immunol.* 6148-6155.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001) Leishmaniasis. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>
- ZER R., YAROSLAVSKI I., ROSEN L. & WARBURG A. (2001) Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int.J.Parasitol.* **31**, 810-814.