



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EMMANOEL LOSS DIAS**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO AGONISTA DE TLR1/2 (PAM3CSK4) NA  
POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINA LAAG  
ADMINISTRADA POR VIA INTRANASAL CONTRA A LEISHMANIOSE  
VISCERAL MURINA.**

**VITÓRIA  
2016**

**EMMANOEL LOSS DIAS**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO AGONISTA DE TLR1/2 (PAM3CSK4) NA  
POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA VACINA LAAG  
ADMINISTRADA POR VIA INTRANASAL CONTRA A LEISHMANIOSE  
VISCERAL MURINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Coorientador: Sandra Ventorin von Zeidler

**VITÓRIA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D541a Dias, Emmanoel Loss, 1989 -  
Avaliação do papel do agonista de TLR1\2 (Pam3CSK4) na  
potencialização do efeito protetor da vacina LaAg administrada por via  
intranasal contra a leishmaniose visceral murina / Emmanoel Loss  
Dias – 2016.  
80 f. : il.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.  
Coorientador: Sandra Ventorin von Zeidler.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmaniose. 2. Vacinas. 3. Absorção Nasal. I. Gomes, Daniel  
Cláudio de Oliveira. II. von Zeidler, Sandra Ventorin. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

“Avaliação do Papel do Agonista de TLR1/2 (PAM3CSK4) na Potencialização do Efeito Protetor da Vacina LaAg Administrada por Via Intranasal Contra a Leishmaniose Visceral Murina”

Emmanoel Loss Dias

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

---

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (UFES)

Orientador

---

Prof.ª Dr.ª Sandra Lúcia Ventrin von Zeidler (UFES)

Coorientadora

---

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (UFES)

Membro Interno

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Pereira Lima (UFES)

Membro Externo

Vitória-ES, 05 de Setembro de 2016.

*À minha mãe, minha avó, meu orientador e meus familiares, que acima de tudo acreditaram em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Alguns anos atrás, mal me imaginava completando uma faculdade. Hoje estou aqui, no fim de uma das mais difíceis etapas de minha vida, a dedicar e agradecer.

Obrigado a Deus, por me dar saúde e permitir que a vida me concedesse tal oportunidade, obrigado por colocar cada uma destas incríveis pessoas que passaram por mim durante este caminho.

À minha mãe, completo outro sonho, desperto um orgulho e hoje, devolvo a ela em forma de amor e dedicação, toda a vida que me foi dada. À ti, não lhe entrego o mundo, mas te prometo, que não lhe deixarei nada fugir. Você merece muito mais que um punhado de palavras.

A meu Orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, por permitir que eu pudesse participar de tal projeto, por enriquecer meu conhecimento a cada dia e por acreditar em mim até o final. Você não só me direcionou durante este caminho, como também me ajudou a levantar várias vezes, mesmo quando já havia desistido.

A cada um do laboratório de Imunologia Molecular e Celular, deixo minha admiração e meu agradecimento pelas inúmeras vezes que acrescentaram em meu trabalho. Luciana, Lorenzo, Bruna, Régia, Glênia, Marcelle, Caio, Estevão, Carlinha, Naira, Renan, Vivian, Priscila, Lau, Ariany e Rose, sem vocês, jamais teria conseguido!

Agradeço a cada professor e aluno do PPG Biotecnologia.

Agradeço a banca avaliadora, por dedicarem um tempo e engrandecer meu trabalho com seu conhecimento.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos e a FAPES pelo financiamento de meu projeto.

Agradeço também aos nosso pequeninos camundongos, sem eles, nada disso seria possível.

Obrigado!

"Nada é permanente nesse mundo cruel. Nem mesmo os nossos problemas."

**Charles Chaplin**

## RESUMO

PAM3CSK4 (PAM) é um agonista sintético de TLR1/2 composto por um lipopeptídeo triaciletado que imita a lipoproteína de bactérias e que apresenta uma potente capacidade em induzir atividade pró-inflamatória mediada por ativação de NF- $\kappa$ B. No presente estudo, foi investigada a capacidade da imunização intranasal com antígenos totais de promastigotas de *L. amazonensis* (LaAg) associados ao adjuvante PAM em potencializar a resposta imune imunogênica antígeno em camundongos. Assim, camundongos BALB/c foram imunizados por via intranasal (instilação nasal) com 20  $\mu$ g de LaAg associados com 20  $\mu$ g do adjuvante PAM em doses intervaladas por 7 dias. PBS, LaAg ou PAM sozinhos foram utilizados como controle. A dosagem das transaminases e da creatinina no soro animais demonstraram a biocompatibilidade e segurança da combinação LaAg/PAM. Os camundongos vacinados com LaAg/PAM demonstraram maior reação de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH) 24 e 48 horas, respectivamente, após a injeção de 20  $\mu$ g de LaAg na pata traseira, quando comparado ao grupo controle. Além disso, em comparação aos outros grupos, os esplenócitos de animais vacinados com LaAg/PAM produziram mais IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 depois do reestímulo *in vitro* com o antígeno LaAg (50  $\mu$ g/mL). Células analisadas *ex vivo*, demonstraram que a combinação LaAg/PAM não alterou a frequência das populações de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória e totais no baço. A vacinação com LaAg/PAM foi capaz de induzir a redução no parasitismo do fígado, em comparação com o grupo não tratado. Os animais vacinados com LaAg/PAM demonstraram um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  e a diminuição na produção de IL-4 nos sobrenadantes do baço. Além disso, observou-se um aumento significativo na produção de NO nos sobrenadantes do fígados dos animais vacinados com LaAg/PAM. Em conjunto, nossos dados demonstram, pela primeira vez a possibilidade de imunização intranasal com os antígenos totais de *L. amazonensis* (LaAg) associados com PAM como um mecanismo eficaz de indução de imunogenicidade.

Palavras-chave: Leishmaniose LaAg, Pam3CSK4, vacina.



## ABSTRACT

PAM3CSK4 (PAM) is a synthetic TLR1/2 agonist compound by triacylated lipopeptide that mimics bacterial lipoprotein and presenting a potent ability to induce proinflammatory activity mediated by NF- $\kappa$ B activation. In the present study, we investigated the ability of intranasal immunization with whole *L. amazonensis* promastigote antigens (LaAg) associated with PAM adjuvant to improve the immunogenic immune response in mice. So, BALB/c mice were immunized by intranasal route (nasal instillation) with 2 doses of 20  $\mu$ g of LaAg associated with 20  $\mu$ g of PAM adjuvant intercalated for 7 days. PBS, LaAg or PAM alone were used as controls. The measurement of transaminases and creatinine in animals serum demonstrated the biocompatibility and safety of the combination LaAg/PAM. LaAg/PAM vaccinated mice showed the highest level of cutaneous hypersensitivity reaction (DTH) 24 and 48 hours respectively, after hind footpad LaAg injection (20  $\mu$ g) when compared to control groups. In addition, compared to control groups, splenocytes from LaAg/PAM vaccinated mice produced significant IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 amount after *in vitro* recall with LaAg antigen (50  $\mu$ g/mL). Analyzed cells *ex vivo*, demonstrated that the combination Lag/PAM did not alter the frequency of CD4 + cells and CD8 + memory and total populations in the spleen. The vaccination with LaAg/PAM was able to induce reduction in parasitism of the liver, compared to the untreated group. The animals vaccinated with Lag/PAM showed a significant increase in IFN- $\gamma$  production and decreased in IL-4 production on the spleen supernatant. In addition, a significant increase of NO was observed in liver macerated supernatants vaccinated with LaAg/PAM. Together, our data showed for the first time the feasibility of intranasal immunization with whole leishmanial antigens (LaAg) associated with PAM as an effective mechanism to induce a Leishmania immunogenicity.

Keywords: Leishmaniasis, LaAg, Pam3CSK4, Vaccine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante PAM3CSK4.** Dosagem de transaminases AST (A), ALT (B) e creatinina (C) do soro de camundongos vacinados e eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização. O controle positivo recebeu tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. \*\*\*\* p < 0,0001 em relação à CCl<sub>4</sub>..... 45
- Figura 2: Efeito da vacinação intranasal na hipersensibilidade cutânea.** Camundongos imunizados foram injetados na pata traseira direita com 20 µg de LaAg, 7 dias após o booster. A espessura do edema foi acompanhada por 72 horas através da medição da pata desafiada e expressa como média do Δ obtido ± DP. (Δ= Espessura do dia avaliado – Espessura natural da pata). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001..... 47
- Figura 3: Efeito da vacinação intranasal na produção de IFN-γ, IL-4, IL-10 e TNF-α.** Sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com LaAg livre ou associado com PAM. Os animais foram eutanasiados 7 dias após o reforço da vacina e os esplenócitos retirados foram reestimulados *in vitro* com 50 µg/mL de LaAg. A dosagem foi feita por ELISA sanduíche 48 horas após a adição do LaAg. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001..... 48
- Figura 4: Efeito da vacinação na população de células T no baço.** Análise da população de linfócitos T em células obtidas do baço de camundongos imunizados de acordo com o protocolo anteriormente citado, desafiados com *L. infantum chagasi*. Células imediatamente obtidas do macerado do baço, foram incubadas com anticorpos anti CD4 (FITC), CD8 (FITC), CD44 (PE) e CD62L (APC) e a fluorescência analisada por FACS. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001..... 50
- Figura 5: Avaliação do parasitismo de camundongos BALB/c desafiados com *L. infantum chagasi* após imunização.** Avaliação da carga parasitária no baço e fígado de animais imunizados por via intranasal com a associação de LaAg/PAM e desafiados com 10<sup>7</sup> promastigotas de *L. infantum chagasi* pela veia caudal, 7 dias após o reforço da vacina. Os animais foram eutanasiados 14 dias após o desafio e avaliação foi feita através do método de diluição limitante (LDA). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001..... 52

**Figura 6: Produção local de citocinas após o desafio.** Análise da produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL10 no sobrenadante de macerado do baço e fígado, retirados de animais imunizados e desafiados com *L. infantum chagasi*. A produção de citocinas foi determinada por ELISA sanduíche. \* p< 0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001, \*\*\*\* p< 0,0001..... 54

**Figura 7: Produção local de NO após o desafio.** Análise da produção local de NO no sobrenadante de macerado do baço e fígado, retirados de animais imunizados e desafiados com *L. infantum chagasi*. A produção de NO foi analisada através do método de Griess. \* p< 0,05, \*\* p< 0,01, \*\*\* p< 0,001, \*\*\*\* p< 0,0001..... 56

## LISTA DE SIGLAS

Ag – Antígeno

ALT – Alanina aminotransferases

APC – Célula apresentadora de antígeno

AST - Aspartato aminotransferase

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CCl<sub>4</sub> – Tetracloreto de carbono

CCR9 - Receptor de quimiocinas CCL25

CD44 – Glicoproteína de membrana que liga à ácido hialurônico e medeia a adesão de leucócitos

CD62L – Glicoproteína que se liga ao CD34 e participa das interações de rolamento com o endotélio

CDs – Células Dendríticas

Células NK – Células natural killers

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CR1 – Receptor do sistema complemento

CR3 – Receptor do sistema complemento

CXCL1 – Citocina pertencente à família CXC

D-MEM - Dulbecco's minimal essential médium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Fcy – Receptor da porção Fc de anticorpos

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FML - Ligante de fucose e manose

gp46 - Glicoproteína de 46 kDa

gp63 - Glicoproteína de 63 kDa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

IFN –  $\alpha$  - Interferon alfa

IFN –  $\beta$  - Interferon beta

IFN –  $\gamma$  - Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL- Interleucina

i.n. - Intranasal

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

LaAg- Antígeno de *Leishmania amazonensis*

LACK- Homólogo ao receptor de proteína kinase C ativada

LAM – *L. major* autoclavada

LiESP – Proteínas secretadas de *L. infantum*

LPG - Lipofosfoglicano

LV – Leishmaniose visceral

LVH – Leishmaniose visceral humana

Mac-1 – Receptor do sistema complemento

MCP-1 – Quimiocina que ativa macrófagos

mL- Mililitro

$\mu$ L- Microlitro

NALT - tecido linfoide associado à nasofaringe

NO - Óxido nítrico

PAM – Pam3CSK4

PBS - Salina tamponada com fosfato

PS – Fosfatidilserina

PRRs – Receptor de reconhecimento padrão

RACKs - Receptores de proteína quinase C ativada

SFB – Soro fetal bovino

T CD4+- Linfócito T auxiliar

T CD8+- Linfócito T citolítico

Th0- T helper tipo 0

Th1- T helper tipo 1

Th2- T helper tipo 2

TLRs - Receptores tipo Toll

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>17</b>
1.1 Leishmanioses	17
1.2 Epidemiologia das leishmanioses	18
1.3 Etiopatogênese	19
1.4 Resposta imune na leishmaniose visceral	20
1.5 Vacinas	24
1.6 Vacinas de mucosa	26
1.7 Antígeno bruto de <i>L. amazonensis</i> (LaAg)	29
1.8 Adjuvantes	30
1.9 Adjuvante PAM3CSK4	31
<b>2. Justificativa</b>	<b>34</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
<b>4. Materiais e métodos</b>	<b>38</b>
4.1 Animais	38
4.2 Cultivo do parasita e preparo do antígeno total	38
4.3 Imunização intranasal	39
4.4 Infecção	39
4.5 Dosagem de transaminases (ALT e AST) e Creatinina	39
4.6 Teste de hipersensibilidade tardia	40
4.7 Obtenção de células do baço	40
4.8 Obtenção de células do fígado	41
4.9 Avaliação da memória imunológica por citometria de fluxo	41
4.10 Dosagem de NO	42
4.11 Dosagem de citocinas	42
4.12 Determinação da carga parasitária	43
4.13 Análise Estatística	43
<b>5. Resultados</b>	<b>45</b>
5.1 Hepato e nefrotoxicidade da vacina LaAg livre ou associada ao PAM3CSK4 <i>in vivo</i>	45
5.2 Imunogenicidade da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante PAM	47
5.3 Imunidade protetora da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante PAM3CSK4	50
<b>6. Discussão</b>	<b>59</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>64</b>

**8. Referências.....66**



## **INTRODUÇÃO**

# 1. Introdução

## 1.1 Leishmanioses

Leishmaniose é um termo utilizado para definir um complexo de doenças clinicamente diferente, causadas por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania*. Essas manifestações podem variar de lesões cutâneas não letais, caracterizadas pelo infiltrado inflamatório no local da picada, com tendência à cura instantânea, até o acometimento dos órgãos internos, resultando na forma mais letal da doença. Os principais determinantes para essa variação clínica, são a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, dividimos a leishmaniose em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar, subdividida em cutânea simples, cutânea difusa e mucocutânea, e a Leishmaniose Visceral (LV) (Mccall *et al.*, 2013), ao qual será foco deste estudo.

A transmissão dessa antropozoonose, ocorre quando fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomya* (dependendo da região), contaminadas por formas promastigotas metacíclicas do parasita, transmitem o parasita ao realizar o repasto sanguíneo no homem e em outros animais vertebrados. Estes insetos se infectam ao se alimentarem nos reservatórios da doença, onde formas amastigotas do parasita capturadas, ao alcançarem o lúmen do inseto, sofrem divisão e se transformam em formas promastigotas. O parasita rapidamente coloniza o trato digestório do flebotomíneo e permitindo a infecção de um novo hospedeiro vertebrado. Os principais reservatórios destes parasitas são os cães, marsupiais e roedores (Cecilio *et al.*, 2014; Cecílio *et al.*, 2014).

A LV, também conhecida como kala-azar (ou calazar), é resultado do parasitismo pelas espécies *Leishmania infantum chagasi* e *L. donovani*. Essa doença é caracterizada principalmente pelo acometimento de órgãos ricos em macrófagos como o baço, fígado e medula óssea. Pacientes com LV apresentam aumento dos linfonodos, febre, pneumonia, fibrose septal, anemia, perda de peso, nefrite, hipergamaglobulinemia, sangramentos, distensão abdominal (hepatoesplenomegalia) e nos casos mais graves, imunossupressão (Manual da Vigilância Sanitária, 2014).

## 1.2 Epidemiologia das leishmanioses

A leishmaniose (tegumentar e visceral) é considerada a quinta doença infecto-parasitária de maior importância em todo mundo, sendo classificada como nível 1 de prioridade pela Organização Mundial da Saúde (Who, 2012). A doença possui ampla distribuição apresentando relatos em todo o mundo, sendo endêmica em 98 países e 5 continentes acometendo, principalmente, as regiões tropicais e subtropicais. A estimativa é de que, aproximadamente, 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção e sabe-se que, a cada 600 mil casos reportados de leishmaniose, é estipulado um número de 1,3 milhões de infectados. Destes 1,3 milhões de casos, 300 mil são viscerais e cerca de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Nas américas, 12 países são acometidos pela LV, registrando um total de 45.490 casos nos períodos de 2001 a 2013, tendo uma média de 3.499 casos por ano. Destes 12 países, o que lidera o ranking, com 96% dos casos, é o Brasil. Em 2013, dos 3.389 casos registrados nas américas, 3.253 casos ocorreram no Brasil (PAHO, 2015).

Nas últimas três décadas, foram reportados mais de 70.000 casos e mais de 3800 mortes no país. Este número preocupa ainda mais quando comparamos o eventual aumento nos casos registrados anualmente. No período de 1985 à 1989 foram registrados 1.601 casos, porém no período de 2000 à 2004 estes números aumentaram para 3.630 casos reportados anualmente (Werneck e Fundação Oswaldo Cruz, 2010).

No Brasil, a doença acomete todos os estados, com destaque para a região nordeste que concentra o maior número de casos (92%), onde os mais afetados são Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. No estado do Espírito Santo houve registro de 4 casos no ano de 2013, demonstrando um coeficiente de incidência de 1,22 casos a cada 100.000 habitantes (DATASUS, 2013).

Outro fato preocupante, é a urbanização da LV, essa doença que originalmente era considerada rural, hoje afeta cidades de tamanhos médio e grande. Esta expansão é consequência das atividades humanas, que resultaram em mudanças socioeconômicas, físicas e biológicas, culminando na adaptação dos vetores e dos reservatórios das áreas urbanas (Lara-Silva F de *et al.*, 2015).

### 1.3 Etiopatogênese

A sobrevivência do parasita depende do sucesso na transmissão do vetor invertebrado para o reservatório vertebrado. Estes parasitas, possuem como vetor invertebrados fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo os únicos, atualmente comprovados, capazes de transmitir as espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos (Dostalova e Volf, 2012). No Brasil, as principais espécies relacionadas a transmissão dos parasitas são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Marzochi *et al.*, 2009).

As leishmanias possuem duas apresentações morfológicas identificáveis no ciclo: uma extracelular chamada de promastigota, possuindo um longo flagelo e abrigando o interior do vetor invertebrado e outra intracelular obrigatória não flagelada, ao qual parasita células do sistema fagocítico mononuclear e são denominadas de amastigota (Pace, 2014).

O ciclo de vida se inicia no interior do trato digestivo do inseto vetor, onde os parasitas passam por diferentes transformações morfológicas de tal forma que, ao final, assumem a forma infectante chamada de promastigota metacíclica. A multiplicação do protozoário causa dano ao canal alimentar do inseto, onde o parasita acumula e forma uma obstrução no canal alimentar, esta obstrução e o dano causado favorecem o refluxo quando acontece o repasto sanguíneo, permitindo a inoculação da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado (Dostalova e Volf, 2012). Durante o repasto sanguíneo ocorre a inoculação da saliva do mosquito no sítio da picada. Esta saliva possui moléculas capazes de potencializar a infecção da *Leishmania*. Entre essas moléculas estão a apirase, um intenso anticoagulante, capaz de hidrolisar ATP e ADP em AMP, impossibilitando a agregação plaquetária (Kamhawi, 2000). Além desta, existem outras moléculas como a Maxadilan, caracterizada como um potente vasodilatador, com função imunomoduladora e indutora da produção de citocinas do tipo Th2, supressão da expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e da atividade quimiotática de macrófagos (Gomes e Oliveira, 2012). Estes fatores resultam na inibição do mecanismo local de proteção do hospedeiro, permitindo a proliferação do parasita no hospedeiro e a manutenção da infecção (Abdeladhim *et al.*, 2014).

#### 1.4 Resposta imune na leishmaniose visceral

Durante a transmissão do parasita para o vetor vertebrado, macrófagos e neutrófilos são rapidamente recrutados. Isto ocorre pois o tecido danificado durante a inoculação do parasita e a saliva do flebotomíneo, que possui proteofosfoglicanos secretados pelo parasita no trato digestivo do inseto, induzem a formação de um infiltrado celular caracterizado pela presença de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e monócitos. Este recrutamento celular é consequência das quimiocinas secretadas pelos macrófagos ativados, que induzem a expressão aumentada de CCL2/MCP-1 e CXCL1, aumentando, respectivamente, o influxo de monócitos e neutrófilos. Além disto, a ativação de macrófagos, resulta na produção de citocinas, como IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-12, e de quimiocinas, consequentemente ativando e recrutando outros tipos celulares para o sitio de infecção (Racoosin e Beverley, 1997; Teixeira *et al.*, 2005).

O processo de captação da *Leishmania*, pelas células dos hospedeiro, é iniciado através da identificação do movimento do flagelo do parasita e da interação de receptores presentes na superfície da célula dos hospedeiro e moléculas presentes na superfície do protozoário que desencadeiam alterações celulares, dando início a fagocitose, a resposta imune do hospedeiro e a produção de moléculas imunomoduladoras pelo parasita (Liu e Uzonna, 2012; Podinovskaia e Descoteaux, 2015). Este processo tem início a partir da identificação do patógeno, que através do uso de receptores de complemento (CR1, CR3, Mac-1), de Fibronectina, de Manose-Fucose e de Fc $\gamma$ , presentes nos macrófagos, reconhecem os antígenos do protozoário (Kane e Mosser, 2000). Estes antígenos presentes no parasita são considerados, em alguns casos, fatores de virulência. Exemplos dos mesmo seriam os glicoconjugados (LPG e GIPL), o gp63, alguns proteofosfoglicanos e proteases de cisteína (Isnard *et al.*, 2012).

Além disso, alguns receptores de reconhecimento padrão (PRRs), exemplos como os receptores tipo Toll (TLRs) podem levar a maturação e ao recrutamento de células dendríticas (CDs), onde a apresentação dos antígenos processados resulta no início à imunidade adaptativa (Aderem e Underhill, 1999; Kaisho e Akira, 2001).

Outra célula importante são os neutrófilos, que rapidamente são recrutados para o local de inoculação, e encontradas em maioria de 1-12 horas após a infecção. Estas células

têm geralmente um papel protetor na maioria das formas de infecções por *Leishmania*, embora os resultados são dependentes da espécie envolvida, das características genéticas do hospedeiro e o estado de apoptose ou necrose dos neutrófilos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012). Os neutrófilos podem fagocitar ativamente os promastigotas, assim como produzir fatores microbicidas contra o patógeno, tais como NO (Charmoy *et al.*, 2007), elastase de neutrófilos (NE) (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007), fator ativador de plaquetas (CAMUSSI, *et al.*, 1987), e armadilhas extracelulares de neutrófilos (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009).

A sobrevivência da *Leishmania* após sua captura depende da expressão de moléculas derivadas dos patógenos e da interação com as células do hospedeiro. Os mecanismos de defesa utilizados pelo parasita permitem que este consiga se reproduzir e estabelecer a infecção. Um exemplo deste mecanismo de defesa são os parasitas inviváveis que permanecem no local de infecção. Neste contexto, a expressão aumentada de fosfatidilserina (PS) e seu reconhecimento pelas células inflamatórias, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando em um processo acelerado de apoptose dos neutrófilos (Fadok *et al.*, 1998; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012), facilitando o estabelecimento infeccioso. Outro mecanismo de modulação da apoptose é o aumento na fosforilação de ERK1/2 nas células, resultando no atraso da apoptose através da manutenção da expressão de moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bfl-1 (Sarkar *et al.*, 2013). Outras moléculas como LPGs e gp63 podem evitar a formação da cascata do sistema complemento (Puentes *et al.*, 1990; Joshi *et al.*, 2002; Spath *et al.*, 2003), bem como estarem envolvidas no bloqueio da acidificação do fagossomo (Vinet *et al.*, 2009). A fosfatase ácida tartarato-resistente pode inibir a fusão do lisossomo, a explosão respiratória e a produção de ânion superóxido em neutrófilos humanos e de camundongos (Remaley *et al.*, 1984; Tuwajiri *et al.*, 1990). Em alguns casos, as próprias células do hospedeiro, como os neutrófilos, podem servir como “Cavalos de Tróia”, permitindo a entrada silenciosa na célula do hospedeiro (Van Zandbergen *et al.*, 2004).

Conhecidas como as mais potentes células apresentadoras de antígeno (APCs), as células dendríticas (CDs) são especializadas na captura do antígeno, no processamento e na apresentação para células T. Dessa forma, estas células tem um papel central de orquestrar a resposta imune na leishmaniose (Leon *et al.*, 2007). Isto ocorre porque as mesmas são capazes de produzirem IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  quando

estimuladas com antígenos de *Leishmania* (Gorak *et al.*, 1998; Von Stebut *et al.*, 1998). Essas mesmas células podem ser de dois tipos, as mielóides que produzem IL-12 ao serem estimuladas através do receptor de TLR 9 e induzem a liberação de IFN- $\gamma$  pelas células NK, sendo citotóxicas, e as plasmocitóides, que são incapazes de fagocitar os parasitas, mas ainda assim produzem IL-12 dependente de TLR9 e também sendo importantes durante a infecção (Schleicher *et al.*, 2007). Como dito anteriormente a produção de IL-12 é criticamente importante, devido a sua capacidade de polarizar a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1, crucial para o desenvolvimento de uma resposta protetora contra o parasita (Von Stebut *et al.*, 1998). Estudos de infecção com *Leishmania*, em modelos experimentais e humanos, mostraram que o parasita é capaz de inibir a produção de IL-12 por CDs, o que compromete a diferenciação de linfócitos T e por consequência a sua eliminação (Scharton e Scott, 1993).

Os macrófagos são as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitas. Essas células podem ser ativadas de diferentes formas e se desenvolverem em diferentes subtipos funcionalmente distintos, resultando na eliminação ou não do parasita. Essa ativação é dividida em dois espectros distintos, a via clássica e a via alternativa. A ativação clássica é mediada por moléculas de IFN- $\gamma$ , que são produtos de linfócitos Th1 e células NK. Estes macrófagos ativados, produzem óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) e uma enzima que catalisa a L-argenina para gerar óxido nítrico (NO) (Liew, Li, *et al.*, 1990). O NO é conhecido como um importante antimicrobiano que tem papel majoritário em eliminar parasitas intracelulares, é sabido também que o iNOS possui um importante papel na eliminação do parasita, onde já foi demonstrado que, camundongos com deficiência na produção de iNOS possuem suscetibilidade a infecção, mesmo na presença de uma forte resposta do tipo Th1 (Seger e Krebs, 1995; Santos *et al.*, 2006). Além deste mecanismo de ativação, é proposto que, macrófagos, mesmo na ausência de IFN- $\gamma$ , podem ser ativados pela ativação clássica, quando estimulados com IL-1, TNF, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Estas moléculas estão ligadas ao aumento do pH no interior do fagossomo e na regulação positiva de iNOS, levando a produção de NO (Bronte e Zanovello, 2005). Em contraste, a ativação alternativa é induzida por citocinas do tipo Th2 como a IL-4 e IL-13, que regulam a biossíntese de poliamina e favorece a sobrevivência no interior dos macrófagos. Outra citocina que regula negativamente a ativação de macrófagos pela via clássica é a IL-10, que inibe a explosão respiratória, a produção de citocinas pró-inflamatórias e as respostas

linfoproliferativas em resposta ao reestímulo com antígenos do parasita (Gordon, 2003; Hailu *et al.*, 2005; Kropf *et al.*, 2005).

Diferentemente do que ocorre na infecção murina por *L. major*, a associação entre a resposta linfocitária do tipo Th1 e a resistência à doença ou da resposta linfocitária do tipo Th2 e susceptibilidade na leishmaniose visceral humana (LVH) ainda não é bem compreendida (Antonelli *et al.*, 2004; Khalil *et al.*, 2005). É possível que exista uma dicotomia entre as respostas do tipo Th1 e Th2, confirmada pelos níveis elevados de IFN- $\gamma$  e IL-4 detectados em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LV causada por *L. donovani* estimuladas *in vitro* com antígenos do parasita. No entanto, é de conhecimento que a incapacidade de proliferação de células T e a regulação negativa na produção de IFN- $\gamma$  resulta no aumento da carga parasitária observada tanto em modelos experimentais quanto na LV humana. Indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta linfoproliferativa do tipo Th2 aumentada ou a predominância na produção de citocinas produzidas por células TCD4<sup>+</sup> Th2. Neste tipo de resposta, é predominante a produção de IL-10 e IL-4 quando comparada a quantidade de IFN- $\gamma$  secretada (Carvalho *et al.*, 1985; Ghalib *et al.*, 1993; Sundar *et al.*, 1997).

Durante décadas os estudos realizados demonstraram que o desempenho de células B e os anticorpos tem pouca importância no caráter protetor durante a LV (Campos-Neto e Bunn-Moreno, 1982; Caldas *et al.*, 2005). Corroborando com isto, estudos anteriores afirmam que a maioria dos anticorpos IgG circulantes não são parasito-específicos, mas sim resultados da ativação de células B policlonais (Chavas e Guimaraes Ferri, 1966; Ghose *et al.*, 1980). Autoanticorpos são achados recorrentes em pacientes com LV e estão frequentemente associados à glomerulonefrites (Agu *et al.*, 1981; Galvao-Castro *et al.*, 1984). No entanto, altos índices de anticorpos anti-Leishmania são encontrados no soro de pacientes, o que surpreende, pois não é definida a real função destes anticorpos na proteção ou na patogênese da doença. Porém a ativação aumentada de células B resulta em altos níveis de imunoglobulinas IgG e IgM no plasma dos pacientes, facilitando o diagnóstico da LV (Sundar e Rai, 2002). Estudos demonstram que, a administração passiva de imunoglobulinas IgG anti-Leishmania em camundongos BALB/c infectados com *L. major* resultou no aumento da lesão nos camundongos, o que provavelmente está relacionado a capacidade deste anticorpo induzir a produção de IL-10 por macrófagos. Neste mesmo estudo, animais que



possuíam deficiência na produção de IgG eram mais resistentes a doença (Miles *et al.*, 2005). Este estudo pode ser comparado com o observado em pacientes que apresentam títulos de anticorpos anti-Leishmania elevados durante a fase ativa da doença e uma posterior queda nesses títulos após uma cura bem sucedida.

## 1.5 Vacinas

Na atualidade não existem vacinas aprovadas para uso humano (Gillespie *et al.*, 2016) e as opções de tratamento para leishmaniose não são ideais, possuem alta toxicidade, são feitas através da administração parenteral com longos períodos de duração, bem como apresentam alto custo. Estes fatos contribuem com a ineficácia do tratamento, o abandono do paciente e o aumento da resistência ao tratamento (Sundar e Rai, 2005; Who, 2012), tornando urgente e necessário o desenvolvimento de uma vacina efetiva como medida de prevenção da doença.

De forma geral, as vacinas podem ser classificadas em primeira, segunda ou terceira geração. As vacinas de primeira geração ou brutas, são compostas por microrganismos mortos ou atenuados, ou misturas não caracterizadas de antígenos. Um exemplo clássico deste tipo de vacina é a leishmanização, um processo que consiste na inoculação de promastigotas de *L. major* em locais do corpo que não estão expostos, a fim de evitar o estabelecimento de infecções cutâneas em áreas expostas, como a face (Sukumaran e Madhubala, 2004).

A Leishvacin®, outro exemplo de vacina de primeira geração, é uma vacina intramuscular ou subcutânea composta por promastigotas de *L. amazonensis* lisados que foi desenvolvida pelo Dr. Wilson Mayrink e produzida a partir de 1991 pela BioBrás em Monte Carlo (Minas Gerais)(Mayrink *et al.*, 1979). Esta vacina chegou a ir para teste clínico, onde estudos de fase I atestaram sua segurança (Marzochi *et al.*, 1998) e estudos de fase II comprovaram sua imunogenicidade (De Luca *et al.*, 1999). No entanto, estudos de fase III demonstraram sua ineficácia em humanos (Velez *et al.*, 2005) e resultaram na descontinuidade na produção da mesma. Na Colômbia, um grupo de pesquisadores utilizou *L. amazonensis* autoclavada (LAM) + *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) na imunoterapia contra leishmaniose cutânea, onde chegaram a ser feitos testes clínicos de fase I e II (Velez *et al.*, 2000). No Equador, um composto trivalente de promastigotas de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* foi

utilizado em testes clínicos, onde foram atestadas a segurança, a imunogenicidade e a eficiência da vacina. No entanto, mesmo alcançando 73% de eficácia, estudos posteriores revelaram que a proteção não era eficaz 19 meses após a vacinação (Armijos *et al.*, 1998; Armijos *et al.*, 2003). No Iran, outro estudo duplamente cego utilizando ALM, comparando o uso ou não BCG, demonstrou que a mistura era segura, mas com baixa imunogenicidade (Momeni *et al.*, 1999).

Ao contrário, vacinas de segunda geração utilizam organismos vivos geneticamente modificados, subunidades definidas e frações brutas de antígenos. Embora grandes níveis de resposta específica tenham sido conseguidos com sua utilização, a dificuldade de escalonamento para produção em larga escala e alto custo são grandes limitadores de sua utilização (Silvestre *et al.*, 2008).

Estudos com a glicoproteína gp63 ou leishmanolisina, demonstraram que quando utilizada como vacina somada a lipossomos, era capaz conferir imunidade à *L. donovani* por até 12 semana em camundongos BALB/c (Bhowmick *et al.*, 2008). Outro exemplo são vacinas compostas pelas proteínas Leish-111f ou LEISH-F1, um composto de múltiplos componentes (antígenos purificados TSA, LmSTI1 e LeIF) que em ensaios clínicos demonstrou serem eficazes contra leishmaniose cutânea e de mucosa. (Coler *et al.*, 2002). Este mesmo composto, quando adicionado a adjuvantes, demonstrou níveis indetectáveis de IL-4 e respostas mistas de IgG1 e IgG2a, resultando em 91,7% de diminuição nos níveis de parasita no baço de camundongos vacinados (Skeiky *et al.*, 2002; Coler *et al.*, 2007). Além disso, podemos destacar as formulações de uso veterinário, sendo estas as únicas liberadas para uso comercial. A primeira delas é a Leishmune®, uma vacina composta pela por ligante de fucose e manose (FML) de *L. donovani*, licenciada para uso veterinário em 2005 pelo Ministério da Agricultura (Moreira *et al.*, 2016). Outra importante formulação é denominada de Leish-Tec®, ao qual é comercializada desde 2014, composta pela proteína recombinante A2 de *L. donovani* (Regina-Silva *et al.*, 2016). E por último a vacina CaniLeish® (Virbac, França), recentemente lançada e licenciada para uso na Europa. A mesma é composta por proteínas secretadas de *L. infantum* (LiESP), produzidas e purificadas em laboratório, e o adjuvante QA-21 (fração da saponina de *Quilaja saponária*, purificada), capaz de induzir a proliferação de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ , ativando macrófagos e reduzindo a carga parasitária nos locais de infecção (Moreno *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2014).

Vacinas de terceira geração ou vacinas gênicas são compostas por genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes, aos quais são inseridos em plasmídeos e utilizados na imunização. Este tipo de vacina apresenta algumas vantagens que incluem a capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas às selvagens, maior estabilidade, capacidade de gerar respostas tanto humorais, quanto celulares mais prolongadas e permitir a combinação de diversos imunógenos em uma única preparação. Estas características permitem a imunização simultânea para diversas doenças e diminuem o custo, permitindo o escalonamento e o fácil armazenamento, devido a estabilidade do DNA (Weiner e Kennedy, 1999). Porém, uma série de considerações devem ser feitas quanto a segurança no uso de vacinas de DNA. A integração com o genoma do hospedeiro, pode gerar uma série de erros genéticos que resultariam na ativação de oncogenes ou na inativação de fatores antitumorais, ou mesmo a possibilidade de gerar respostas imunes contra as células transfectadas, levando ao estabelecimento de doenças autoimunes (Gurunathan *et al.*, 2000). No entanto, vacinas como a gp63 recombinante (gp63-DNA) foram capazes de conferir proteção parcial contra leishmaniose cutânea causada por *L. major*, potencializando a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , conferindo cerca de 30% de proteção (Xu e Liew, 1995). A soma dos genes gp63 + gp46 + CPb aplicado junto com o uso do adjuvante VR1012 foi capaz de gerar proteção de 80% em camundongos BALB/c contra *L. mexicana* (Dumonteil *et al.*, 2000). Outros exemplos seriam os genes da LACK-PB, TSA, A2 que quando utilizados na imunização, demonstram que esta associação somada a adjuvantes resulta em respostas Th1 elevadas, levando a proteção de camundongos BALB/c (Iborra *et al.*, 2004; Lange *et al.*, 2004; Zanin *et al.*, 2007). Como visto, uma série de vacinas genéticas tem sido utilizada em modelos experimentais, induzindo proteção contra diferentes formas de leishmaniose.

## 1.6 Vacinas de mucosa

A membrana mucosa possui um sistema imune especializado com três funções principais, (I) proteger as membranas das mucosas contra a colonização e invasão de microrganismos potencialmente perigosos, (II) prevenir a captura de antígenos não degradados incluindo proteínas estranhas derivadas da ingestão de alimento, matérias

particuladas e organismos comensais, e (III) prevenir o desenvolvimento de respostas imunes prejudiciais, caso este antígeno já tenha alcançado o interior do corpo. Para isto, existe um eficiente mecanismo de limpeza físico-químico que degrada e repele a maioria das substâncias estranhas. Junto a este sistema, existem estruturas imunológicas grandes e complexas, com alta resposta imune inata e adaptativa, especializada na captação, no transporte, processamento e apresentação de antígenos. E por fim, existem elementos linfóides que, ligados as superfícies internas do corpo, ajudam no desenvolvimento das respostas locais e sistêmicas. Estas características e o fato de que, a maioria dos antígenos tem acesso através de superfícies de mucosa, tornam este tipo de imunização ideal contra patógenos que comumente ganham acesso por essas vias (Holmgren e Czerkinsky, 2005).

Devido a estes aspectos inúmeras vacinas de mucosa são produzidas, explorando bastante este tipo de imunização. Vacinas como a oral para pólio, são capazes de gerar proteção e ainda explorar as vantagens do uso desta via. Na proteção contra a poliomielite, a via de mucosa produz anticorpos IgA que impedem o acarretamento da doença no sistema nervoso central, além de gerar anticorpos locais, no intestino, conhecido como o principal sitio de entrada e multiplicação do vírus, impedindo parte da transmissão deste patógeno (Zhaori *et al.*, 1988). Outros exemplos seriam a imunização contra *Salmonella* (Acharya *et al.*, 1987) e a *Vibrio cholerae* (Trach *et al.*, 1997).

Dentre as mucosa, a via nasal tem tido grande destaque. Vacinações contra doenças virais como *Influenza* (Grohskopf *et al.*, 2015) e *Papiloma* (Dupuy *et al.*, 1999); ou modelos de infecção bacteriana como *Bordetella* (Kamachi *et al.*, 2003) e *Chlamydia* (Svanholm *et al.*, 2000); e modelos de infecção por protozoários como *Plasmodium* (Wu *et al.*, 2000), *L. amazonensis* (Pinto *et al.*, 2004) e *L. infantum chagasi* (Gomes *et al.*, 2007) tem sido utilizado com sucesso. Isto ocorre pois a via intranasal possui algumas vantagens e facilidades que a tornam um eficiente meio de imunização. Entre elas, podemos destacar a alta vascularização, o grande número de microvilosidades que recobrem o epitélio, possibilitando uma grande superfície de absorção (Brandtzaeg e Johansen, 2005), a presença de tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) e a alta resposta imunológica (Baumann, 2008). Contribuindo então para a diminuição na dose e como consequência a menor probabilidade de desenvolver respostas inflamatória inesperadas.

A resposta antígeno-específica se tem início junto com a função das células M, presentes nos folículos do tecido linfóide associado a nasofaringe (NALT). Esta estrutura possui todos os imunocomponentes necessários para geração de uma resposta imune adequada (células T, B e células apresentadoras de antígenos). As células M, localizadas na superfície da mucosa, são responsáveis pelo transporte de macromoléculas e microrganismos presentes no interior do lúmen para dentro das concavidades onde estão presentes as células apresentadoras de antígenos (Mestecky, 2013). Após o transporte, os antígenos são fagocitados, processados e apresentados as células T e B. Estes linfócitos, após sua ativação pelos antígenos apresentados, ativam respostas de acordo com o tipo de antígeno, adjuvante ou o veículo de entrega utilizado. Estas respostas podem desencadear a diferenciação de células T CD4 Th0 em Th1, Th2 ou Th17, podem ativar células T CD8 e estimular o desenvolvimento de células B em plasmócitos, levando a secreção de IgG e IgA, na superfície da mucosa. Tanto as células apresentadoras de antígenos, quanto as células ativadas pelos antígenos, podem produzir respostas diferentes, resultando na produção de um perfil diferente de citocinas (Fujihachi e Mcghee, 2005).

A imunização intranasal leva a expressão de altos níveis de CCR10 e integrina  $\alpha_4\beta_7$  em linfócitos T e B, além de, diminuir a expressão de L-selectina (molécula de adesão responsável pela interação com o endotélio da vênulas nos linfonodos periféricos), o que permite a movimentação de células entre os sítios respiratórios e gênitó-urinário que expressam seus ligantes CCL28 e VCAM1, respectivamente (Kunkel *et al.*, 2003). Além disto, pode ocorrer a indução da expressão de CCR9 e da integrina  $\alpha_4\beta_7$ , que é comumente induzida pela imunização oral, possibilitando a migração de células para tecidos associados a mucosa gastrointestinal, principalmente linfonodos mesentéricos e lamina própria do intestino delgado (Kunkel *et al.*, 2003). Outro fator importante é, células dendríticas fixadas em tecidos associados a mucosa nasal, podem migrar e carrear antígenos para órgãos linfóides não associados (baço e linfonodos periféricos) (Macpherson *et al.*, 1999), promovendo uma resposta imune sistêmica.

Estudos feitos anteriormente já demonstram que, tanto a utilização de antígeno bruto de *L. amazonensis* (LaAg), quanto o DNA expressando a proteína p36 LACK, administrados por via nasal, foram capazes de promover uma resposta protetora contra a leishmaniose cutânea murina, induzindo o aumento na produção de IFN- $\gamma$  e a

diminuição da produção de IL-10 nos linfonodos drenantes distantes da lesão (Pinto *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2007).

### 1.7 Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LaAg)

O LaAg, é uma vacina constituída por promastigotas mortos da cepa MHOM/Br/75/Josefa de *L. amazonensis*. Esta vacina é equivalente a Leishvacin®, desenvolvida pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink e produzida a partir de 1991 pela BioBrás em Montes Claros (MG).

Estes dois compostos possuem um grande potencial imunogênico e foram capazes de produzir respostas imunes a curto prazo. A Leishvacin® foi capaz de conferir proteção contra infecção com *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 (Mayrink *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2014) e sensibilizar linfócitos de indivíduos anteriormente expostos aos antígenos de *L. amazonensis* (Follador *et al.*, 2002), Entretanto, estudos clínicos de fase III demonstraram que esta formulação parenteral foi ineficaz em conferir imunidade protetora contra a infecção humana.

De forma alternativa, nosso grupo vem utilizado o LaAg por vias alternativas de imunização, induzindo significativa proteção contra a leishmaniose cutânea e visceral. A administração oral do LaAg demonstrou induzir proteção em camundongos BALB/c e C57BL/6 desafiados com *L. amazonensis* (Pinto *et al.*, 2003). O mesmo antígeno demonstrou relativa eficácia contra o kalazar murino, entretanto, sua associação ao adjuvante CAF01 foi capaz de potencializar produção de IFN- $\gamma$  e diminuir a carga parasitária em camundongos desafiados com *L. infantum chagasi*, 15 dias após o reforço da vacina (Leal *et al.*, 2015).

Dessa forma, a associação de LaAg com adjuvantes, que não prejudiquem o modelo experimental, podem ser a solução para potencializar a resposta imune protetora já obtida tanto na leishmaniose visceral murina, quanto na cutânea murina, visando a melhora no efeito protetor e a busca da proteção a longo prazo esperada de uma vacina eficaz.

## 1.8 Adjuvantes

Adjuvantes são de forma geral moléculas com função excipientes, que constituem um grupo heterogêneo de compostos que podem ser divididos em sistemas de entrega ou imunoestimuladores (Tandrup Schmidt *et al.*, 2016). Estas moléculas servem basicamente para potencializar a imunogenicidade de antígenos desencadeando reações imunes mais fortes e garantindo proteção de longa duração contra infecções (Bomford, 1998).

Entre os adjuvantes mais comumente utilizados para induzir respostas imunes Th1 em associação a antígenos de *Leishmania*, destacam-se a saponina, oligodeoxinucleotídeos e a IL-12.

Os oligodeoxinucleotídeos correspondem a sequências de dinucleotídeos (citosina, C e guanidina, G) não metilados de bactérias chamados de CpG-ODN. Estas moléculas são capazes de ativar células que expressam TLR9 que por consequência induzem respostas pro-inflamatórias. Estas sequencias de CpG-ODN induzem a proliferação de células B, a produção de IgG, a secreção de citocinas, o aumento da atividade de células natural killer (NK) e a liberação de IFN- $\gamma$ , que por fim, induzem a diferenciação de célula T CD4 em Th1 (Scheiermann e Klinman, 2014). A associação CpG-ODN com a proteína recombinante rgp63 encapsulada com lipossoma catiônico resultou na diminuição da carga parasitária no baço de camundongos, além de aumentar a quantidade de IFN- $\gamma$ , diminuir a quantidade de IL-4 e aumentar a razão de IgG2a/IgG1 em camundongos BALB/c frente ao desafio com *L. major* (Jaafari *et al.*, 2007).

A saponina, em associação com FML (ligante de fucose-manose) de *L. donovani*, foi testada em camundongos Swiss para analisar seu potencial protetor contra a leishmaniose visceral. Esta combinação foi capaz de induzir o aumento significativo de IFN- $\gamma$ , além de diminuir a carga parasitária no fígado dos camundongos, garantindo a proteção contra o parasita (Santos *et al.*, 2002). Em outro estudo, a proteína recombinante LiHyD, purificada e administrada em conjunto com a saponina, foi capaz de diminuir a carga parasitária em diferentes órgão, além de promover a geração de anticorpos específicos do tipo IgG2a e o aumento na quantidade de IFN- $\gamma$ , IL-12 quando comparados ao grupo controle (Lage *et al.*, 2015).

A IL-12 é produzida por células mielóides inflamatórias, possui um importante papel na diferenciação celular e influencia no desenvolvimento de células Th1 produtoras de

IFN- $\gamma$ , além de aumentar a atividade citolítica de células NK e de linfócitos T CD8 (Teng *et al.*, 2015). Por essa capacidade na indução da resposta imune do tipo Th1, a IL-12 já foi testada como adjuvante em diferentes formulações vacinais. Como adjuvante, a IL-12 já foi utilizada em diferentes estudos, Mougneau e colaboradores (Mougneau *et al.*, 1995), clonou uma porção de um antígeno de *L. major* em uma bactéria e imunizou em conjunto com a IL-12 camundongos suscetíveis a leishmaniose. Esta composição foi capaz de diminuir o tamanho da lesão cutânea e gerar uma resposta protetora contra a *Leishmania*. Outro estudo demonstrou que, a imunização utilizando *Lactococcus lactis* que co-expressam LACK e IL-12 foi capaz de induzir respostas do tipo TH1, aumentando as quantidades de IFN- $\gamma$  e protegendo de forma parcial camundongos BALB/c (Hugentobler *et al.*, 2012). Na associação de IL-12 a um antígeno recombinante de *L. donovani* (rORFF) foi observado a proteção de camundongos BALB/c contra a leishmaniose visceral, observou-se também o aumento da resposta linfoproliferativa, além da produção de IFN- $\gamma$ , anticorpos da subclasse IgG2a e baixos níveis de IL-4 direcionando assim, a resposta imune para o tipo Th1 (Tewary *et al.*, 2006).

### **1.9 Adjuvante PAM3CSK4**

Pam3CSK4 (PAM) é um agonista sintético de TLR1/2 que imita o lipopeptídeo (Pam3Cys) presentes nas membranas de ambas as bactérias Gram positivas e Gram negativas (Aliprantis *et al.*, 1999). Esta molécula age como um PAMP (Padrões Moleculares associados a patógenos) e é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), estes encontrados principalmente nas células apresentadoras de antígenos, aos quais são capazes de ativar respostas imunes inatas e adaptativas.

Como dito anteriormente, os adjuvantes buscam intensificar ou direcionar a resposta imune. Dessa forma, Pam3CSK4 age como um modulador das repostas imunes, demonstrando ser eficaz na potencialização de respostas do tipo Th1 e T Reguladoras, e na indução de respostas humorais (Moingeon, 2012). Em consequência disto sua utilização já foi vista em diversos estudos contra diferentes tipos de doenças, incluindo doenças infecciosas e cânceres.



Em infecções virais, a associação de PAM à vacina contra a influenza demonstrou induzir o recrutamento de células sanguíneas e a ativação da via produtora de Interferon (Caproni *et al.*, 2012), e na infecção com vírus sincicial respiratório, PAM foi capaz de melhorar a ligação do vírus as células alvo, resultando no aperfeiçoamento de respostas TLR dependentes (Nguyen *et al.*, 2010).

Nas infecções bacterianas, PAM se mostrou eficaz na indução do efeito protetor em infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), onde o adjuvante demonstrou aumentar os níveis de IFN- $\gamma$  em camundongos (Chen *et al.*, 2016), o aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major* ou *Mycobacterium butyricum* (Gambhir *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015), e a indução da resposta humoral através da produção de subtipos de IgG em camundongos C3H/HeN e C57BL/6 frente ao desafio com toxina da cólera (Gwinn *et al.*, 2013).

Além disto, PAM foi capaz de induzir respostas do tipo Th1/regulatórias em vacinas contra alergia (Lombardi *et al.*, 2008) e até potencializar o efeito de substâncias antitumorais, onde o tratamento com Ara-C associado a PAM, estimulou a regulação positiva de fatores imunoregulatórios (Lee *et al.*, 2014).

Estes exemplos, não só confirmam a capacidade de PAM em ser utilizado como adjuvante, assim como justificam sua utilização nos experimentos com LaAg. Da mesma forma que buscamos proporcionar respostas a longo prazo, também buscamos o aumento da imunogenicidade e o aperfeiçoamento do efeito protetor de LaAg, quando associamos a vacina à PAM.

**JUSTIFICATIVA**

## 2. Justificativa

Como demonstrado, o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura tem se tornado cada vez mais necessário, principalmente devido a dificuldade e aos problemas decorrentes dos atuais tratamentos quimioterápicos. Em nosso grupo comprovamos a eficiência do antígeno total bruto de *L. amazonensis* (LaAg) em induzir respostas protetoras contra a leishmaniose cutânea (PINTO EF et al, 2003) e visceral (LEAL, 2015). Dessa forma, decidimos testar a associação de LaAg ao adjuvante PAM3CSK4, objetivando potencializar o efeito protetor e promover uma imunidade de longa duração contra a leishmaniose visceral murina.

## **OBJETIVOS**

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos imunogênicos e protetores da administração intranasal de antígenos totais de *L. (L.) amazonensis* (LaAg) na forma livre ou associado ao adjuvante PAM3CSK4

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a hepato e nefrotoxicidade da vacina pela dosagem de transaminases (ALS e ALT) e creatinina.
- Avaliar a capacidade imunogênica da vacina através da:
  - a) Resposta ao teste intradérmico de hipersensibilidade do tipo tardia.
  - b) Produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante do baço e fígado macerados.
  - c) Imunofenotipagem de células T e células de memória do baço.
- Avaliar a reposta protetora frente ao desafio com o parasito através da:
  - a) Produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) no sobrenadante do baço e fígado macerados.
  - b) Produção de NO no sobrenadante do baço e fígado macerados.
  - c) Dosagem da carga parasitária no fígado e no baço.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmeas e machos com idade entre 6 a 8 semanas da linhagem BALB/c. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Fluminense e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia, da Universidade Federal do Espírito Santo. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas convencionais recebendo maravalha previamente esterilizada, água filtrada e ração comercial (Purina®) *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas dentro de estufas sob condições apropriadas de temperatura, umidade e luz. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal CEUA-UFES número 014/2011.

### 4.2 Cultivo do parasita e preparo do antígeno total

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa), cedidas gentilmente pela Dra. Bartira Rossi-Bergmann – IBCCF/UFRJ foram utilizadas para preparo do antígeno total (LaAg). O parasita foi cultivado em meio Grace's (Sigma, USA) com pH 6,8, suplementado com 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), 1% Glutamina (Sigma, USA), 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab) e 5% de urina humana previamente centrifugada (1500 rpm/4°C/10 min) e esterilizada em membrana de 0.22µm. A cultura foi mantida em estufa de demanda de oxigênio (BOD) à 25°C até que os parasitas alcançassem o final da fase logarítmica. Após crescimento as leishmanias foram centrifugadas a 3000 rpm/4°C/10 min e lavadas três vezes com solução salina tamponada estéril (PBS). O pellet formado foi submetido a dez ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho-maria (Coelho et al., 2003). Uma alíquota de 200µl do antígeno preparado foi utilizado para dosagem de proteína pelo método de Lowry (Lowry e Cols., 1951). O produto final foi separado em alíquotas de 5 mg/ml e armazenados -70°C para posterior utilização.

### 4.3 Imunização intranasal

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais e imunizados por instilação intranasal com auxílio de uma pipeta automática de 50 µl, regulada para dosagem de 20 µl. A imunização ocorreu em duas doses com intervalo de 7 dias entre elas. Os animais que seriam utilizados no experimento de imunogenicidade foram eutanasiados 14 dias após a 2ª dose. Os que seriam utilizados no experimento de imunidade protetora foram eutanasiados duas semanas após o desafio com *L. (L.) chagasi*, correspondendo ao pico de maior carga parasitária no fígado e no baço dos camundongos.

**Tabela 1: Grupos de camundongos e doses das imunizações**

Grupos	Doses 20µL
<b>G1</b>	PBS
<b>G2</b>	20µg LaAg
<b>G3</b>	10µg PAM
<b>G4</b>	20µg LaAg + 10µg PAM

### 4.4 Infecção

Para a infecção foram utilizados parasitas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), cultivados em meio Grace's suplementado conforme descrito anteriormente. Ao alcançarem o final da fase logarítmica, aproximadamente 4 dias, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm/4°C/10 min e lavada três vezes com PBS. O sedimento foi ressuscitado em PBS e a concentração ajustada para  $10^7$  parasitas/camundongo. Os parasitas foram ressuscitados em 200 µL de PBS injetados através da veia caudal com uma seringa de 1ml.

### 4.5 Dosagem de transaminases (ALT e AST) e Creatinina

A dosagem de transaminases e creatinina foi determinada por ensaio colorimétrico com o kit comercial Doles®, utilizando o soro de animais vacinados. De forma resumida, foi



preparada uma curva de calibração contendo diluições seriadas das substâncias padrão, iniciando nas concentrações de (ALT e AST 1000 $\mu$ /mL) e Creatinina (0,05  $\mu$ g/mL). Na dosagem das transaminases foram utilizadas placas de 96 poços, sendo que, cada poço de reação recebeu 80  $\mu$ L do substrato, 40  $\mu$ L da amostra, do padrão ou do branco e 80  $\mu$ L do reagente de cor, repousando a placa por 20 min à temperatura ambiente. Acrescentou-se a cada tubo 100  $\mu$ L de NaOH 1,2M, e homogeneizou-se novamente, permanecendo em repouso por 2 min até a realização da leitura em espectrofotômetro a 505nm (Varioskan Flash - Thermo®). Na dosagem da creatinina foi preparado o reagente de trabalho e cada poço recebeu 240  $\mu$ L do reagente de trabalho e 60  $\mu$ L da amostra, do padrão ou do branco. Após homogeneização, a placa foi colocada em repouso por 2 min à temperatura ambiente e a leitura feita no espectrofotômetro a 490 nm.

#### **4.6 Teste de hipersensibilidade tardia**

Para avaliação da hipersensibilidade cutânea foram injetados 20  $\mu$ g de LaAg na região do coxim plantar da pata direita de cada camundongo, 1 dia após a infecção. A resposta celular foi acompanhada durante 72 horas através da medição da espessura da pata, com auxílio de um relógio medidor de precisão. A medida foi expressa em média com erro padrão, onde os valores foram obtidos da seguinte maneira. A pata do animal foi medida antes da inoculação e este valor foi definido como o tempo 0. O LaAg foi inoculado e o inchaço foi avaliado nos tempos 18, 24, 48 e 72 horas.  $\Delta$  foi obtido através do cálculo da diferença entre o tempo “n” e o tempo 0, antes da inoculação ( $\Delta$  = espessura no tempo n – espessura no tempo 0 do desafio).

#### **4.7 Obtenção de células do baço**

O baço dos camundongos eutanasiados foram removidos totalmente e macerados em PBS para obtenção de células. Este macerado foi centrifugado a 1500 rpm/4°C/10 min e seu sobrenadante foi utilizado para dosagens de NO e citocinas, sendo descartado em seguida. Os esplenócitos foram ressuspensos com 4 mL de solução de lise de hemácias por 5 min e lavados com de 10 ml de PBS, esta suspensão foi centrifugada a 1500 rpm/4°C/10 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio DMEM suplementado com 2,5% de HEPES (Sigma®, USA), 1% de L-Glutamina (Sigma®, USA), 0,1% de 2-mercaptoetanol (Sigma®, USA), 0,5% Penicilina/Estreptomicina

(Sigma®, USA) e 10 % de Soro Fetal Bovino. Os leucócitos obtidos do baço foram contados em uma câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  / mL. Em seguida as células foram estimuladas, ou não, com LaAg (20 µg/ml), e utilizadas posteriormente na realização dos experimentos, sendo mantidas em estufa à 37°C/5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.8 Obtenção de células do fígado**

O fígado dos camundongos eutanasiados foi removido, pesado e processado para obtenção de células. O macerado foi centrifugado a 1500 rpm/4°C/10 min e seu sobrenadante foi utilizado para dosagens de NO e citocinas, sendo descartado em seguida. A suspensão celular foi utilizada para a quantificação de parasitos, conforme descrito acima.

#### **4.9 Avaliação da memória imunológica por citometria de fluxo**

Os leucócitos estimulados, ou não com LaAg foram ressuspensos e transferidos para placa de 96 poços com fundo U, onde foram centrifugado a 1300 rpm/4°C/3 min. O sobrenadante foi descartado e as células marcadas em dois experimentos diferentes, uma marcação para CD4 (FITC), CD44 (PE) e CD62L (APC) (eBioscience®) e outra para CD8 (FITC), CD44 (PE) e CD62L (APC) (eBioscience®). A marcação foi feita através da adição de 25 µL de FACS Buffer contendo os anticorpos, na proporção de 1:100, incubando a reação à temperatura ambiente por 20 min no escuro. Após o tempo de incubação as células foram lavadas pela adição de 150 µL de FACS Buffer e a suspensão foi centrifugada a 1300 rpm/4°C/3 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas novamente em 300 µL de FACS Buffer. A leitura foi realizada no citometro de fluxo (Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer) onde foram adquiridas 50.000 células, utilizando o programa Attune™ NxT Software. A análise foi feita no FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

#### 4.10 Dosagem de NO

A produção de óxido nítrico (NO) foi fígado, e no sobrenadante da cultura dos esplenócitos estimulados ou não com LaAg. Para analisada pelo método de Griess (1879), onde foram determinadas as concentrações de NO nos sobrenadantes do macerado do baço e do esta análise 50 µL dos sobrenadantes foram plaqueados em duplicatas em placas de 96 poços. Em seguida, as amostras foram incubadas com igual volume de reagente de Griess, composto de 2,5% de ácido orto-fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 1% de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) e 0,1% de α-Naftiletilenoaminohidrocloro (Sigma-Aldrich). A reação foi lida após 10 minutos no leitor de placas utilizando o comprimento de onda de 540 nm (SpectraMax, Molecular Devices). Para determinar a dosagem de NO formado foi utilizado uma curva padrão com nitrato de sódio iniciada com a concentração de 50 µM.

#### 4.11 Dosagem de citocinas

As células extraídas do baço dos camundongos, cultivadas por 48 horas, foram centrifugadas a 1000 rpm/4°C/5 min e o sobrenadante retirado para dosagem de citocinas. As concentrações de IFN-γ, IL-4, IL-10 e TNF-α foram definidas através da utilização de ensaios imunoenzimáticos de captura (ELISA), onde foram utilizados pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilados da eBioscience®, seguindo a recomendação do fabricante. Resumindo o processo, placas de absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Em seguida as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 (0,05%) e as amostras foram adicionadas a elas e incubadas por 2 horas/25°C. As placas foram lavadas novamente e incubadas com o anticorpo biotinilado por 1 hora/25°C. As placas foram lavadas novamente, e cada poço recebeu a adição de estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) por 30 min/25°C. A reação foi revelada com a adição de solução tampão citrato de fosfato com 5% de ABTS e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30vol. Após o aparecimento da cor desejada a reação foi interrompida com dodecil sulfato de sódil (Gibco®) 1% e lida no comprimento de onda de 405 nm (Varioskan Flash - Thermo®).

#### 4.12 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária dos animais infectados por *L. infantum chagasi* foi avaliada através da técnica de diluição limitante (BUFFET et al., 1995). Para isto, 200 µL da suspensão de células do baço e do fígado dos animais obtidas após o maceramento dos órgãos, foram transferidos em duplicatas para o primeiro poço de uma placa de fundo cônico de 96 poços (BRANDplates®). Os demais poços foram preenchidos com 150 µL de Grace's, realizando a diluição em seguida na razão de 1:4.

As placas foram incubadas em estufa BOD por dez dias em estufa a 24°C. Ao final, cada placa foi levada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e observou-se o último poço em que houve o crescimento das formas promastigotas. Foram calculados o número de parasitas por órgão, tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento das leishmanias.

#### 4.13 Análise Estatística

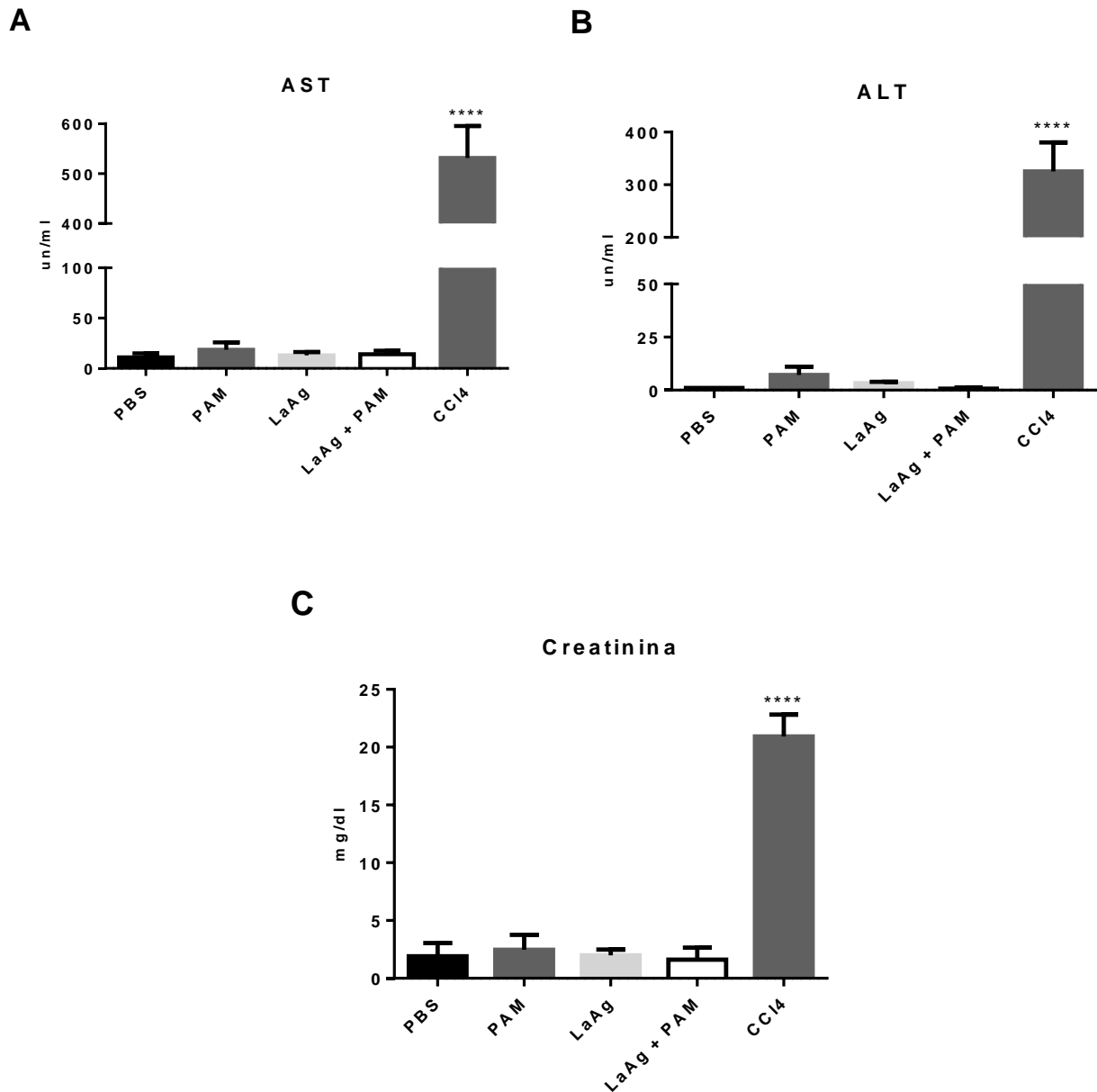
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de *two-way ANOVA* (post hoc teste de Bonferroni). Os experimentos foram considerados estatisticamente significantes para o nível de significância ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

## **5. Resultados**

### **5.1 Hepato e nefrotoxicidade da vacina LaAg livre ou associada ao PAM3CSK4 *in vivo***

Tendo em vista a necessidade de avaliarmos a biocompatibilidade da administração intranasal do adjuvante PAM3CSK4, camundongos foram vacinados, conforme o protocolo anteriormente descrito, eutanasiados 24 horas após o booster da vacina e o soro dos animais coletado para a avaliação das concentrações das transaminases, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e creatinina. Para fins comparativos, um grupo de animais recebeu tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) por via intraperitoneal e foi considerado o controle positivo do experimento.



**Figura 1: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante PAM3CSK4.** Dosagem de transaminases AST (A), ALT (B) e creatinina (C) do soro de camundongos vacinados e eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização. O controle positivo recebeu tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. \*\*\*\* p < 0,0001 em relação à CCl<sub>4</sub>.

Conforme observado na figura 1, não foram constatados aumentos nos níveis de ALT, AST e creatinina entre os grupos avaliados. Todos os valores encontrados se mantiveram significativamente abaixo dos níveis tóxicos observados no controle positivo.

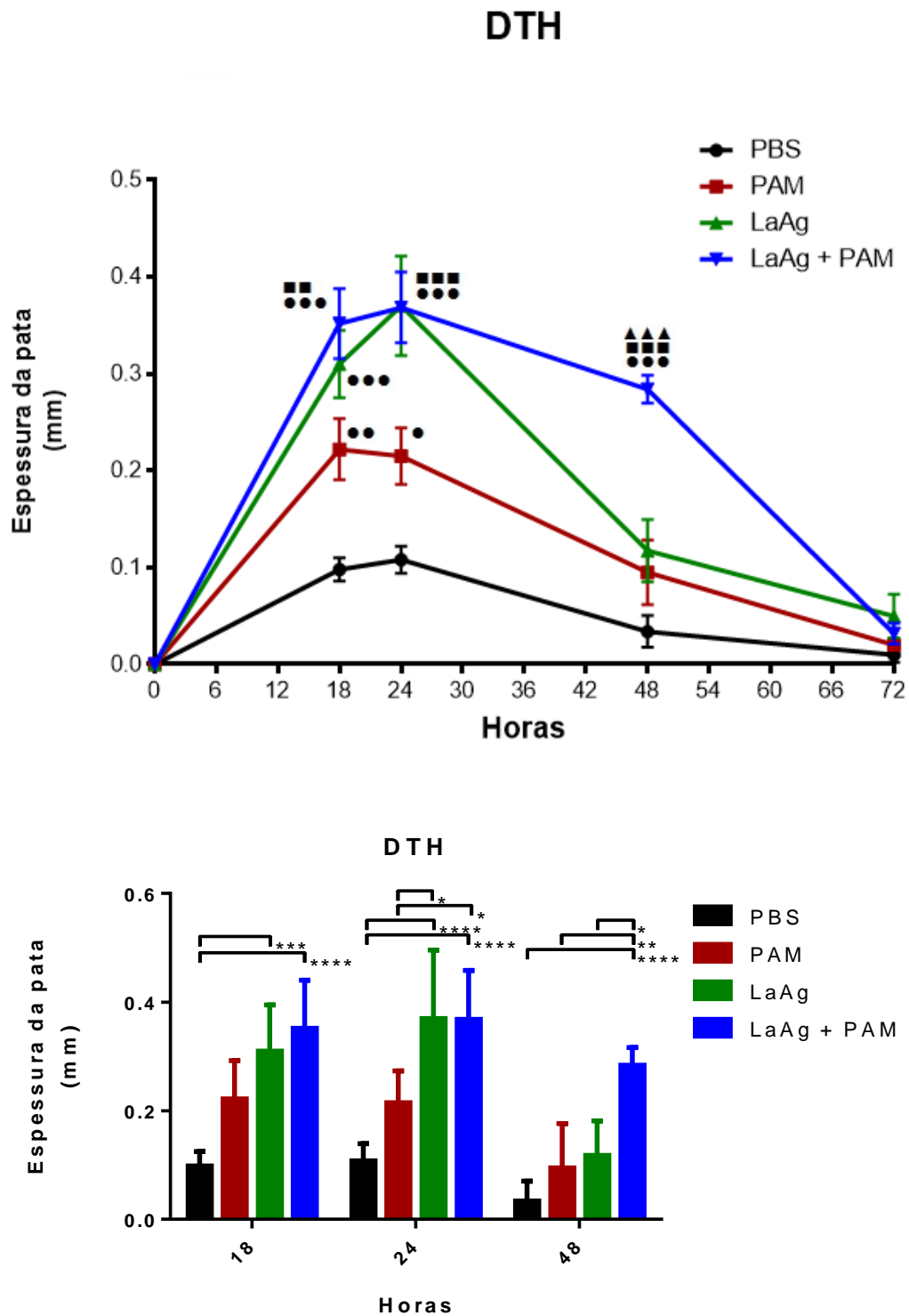
## **5.2 Imunogenicidade da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante PAM.**

Após verificarmos a biossegurança da associação da formulação LaAg/PAM, iniciamos os experimentos afim de avaliarmos a imunogenicidade e a proteção.

Para a avaliação da imunogenicidade, os diferentes grupos foram vacinados e 7 dias após o booster, foram determinadas as respostas cutâneas de hipersensibilidade tardia contra o desafio antigênico cutâneo.

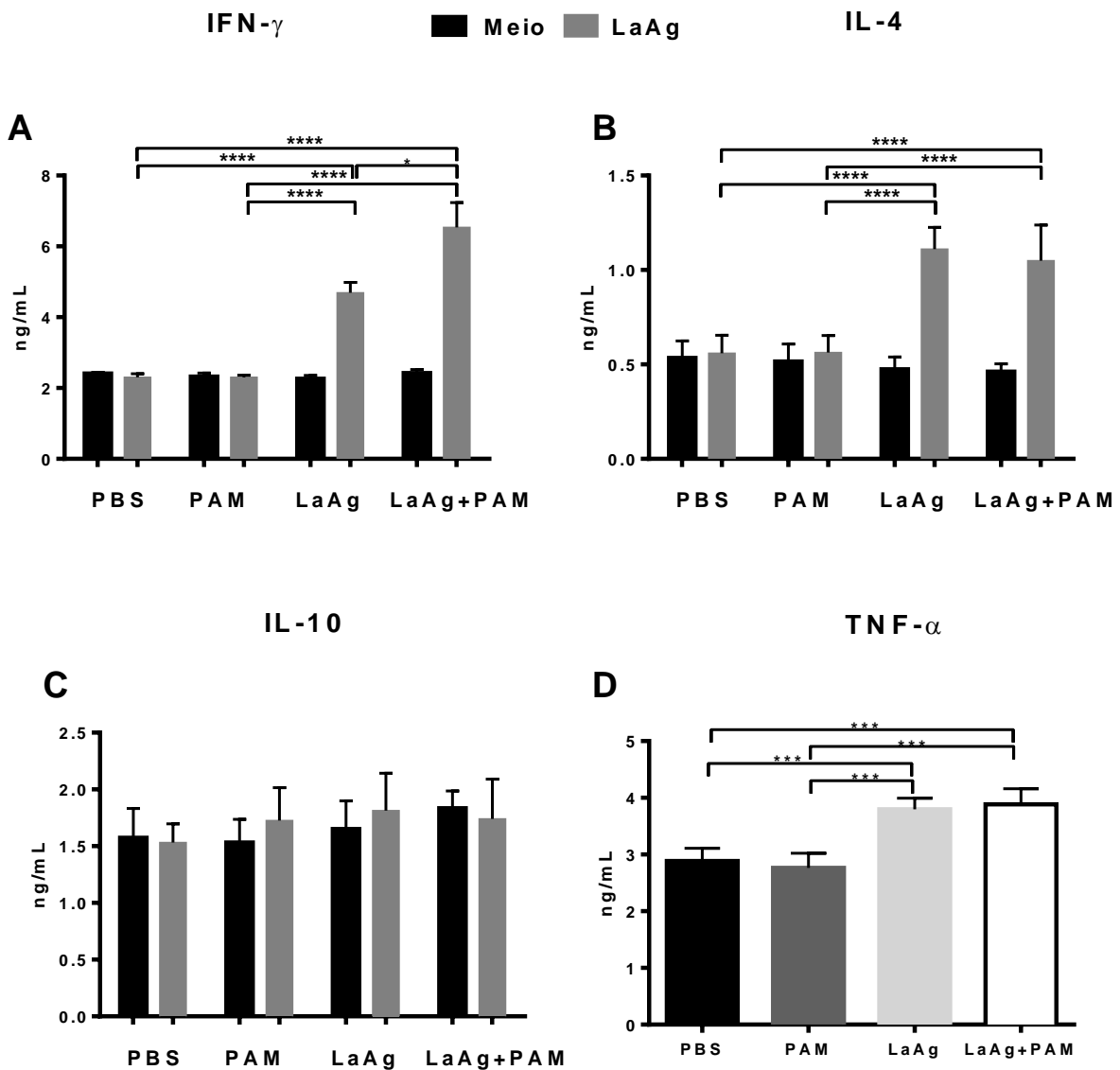
Tanto animais vacinados com LaAg ou a associação de LaAg/PAM, apresentaram picos de resposta em 24 horas significativamente maiores quando comparados aos demais grupos. Sendo que a resposta mais duradoura, permaneceu por até 48h após o desafio antigênico (LaAg + PAM). De forma diferente, os animais vacinados com PAM apresentaram picos de resposta em 18 horas, decaindo após este período, se aproximando aos valores do controle negativo (Figura 2).





**Figura 2: Efeito da vacinação intranasal na hipersensibilidade cutânea.** Camundongos imunizados foram injetados na pata traseira direita com 20  $\mu$ g de LaAg, 7 dias após o booster. A espessura do edema foi acompanhada por 72 horas através da medição da pata desafiada e expressa como média do  $\Delta$  obtido  $\pm$  DP. ( $\Delta$ = Espessura do dia avaliado – Espessura natural da pata). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Em continuidade ao experimento de imunogenicidade, avaliamos a produção específica de citocinas por esplenócitos obtidos dos diferentes grupos e reestimulados *in vitro* por 48 horas com LaAg.



**Figura 3: Efeito da vacinação intranasal na produção de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$ .** Sobrenadante da cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com LaAg livre ou associado com PAM. Os animais foram eutanasiados 7 dias após o reforço da vacina e os esplenócitos retirados foram reestimulados *in vitro* com 50  $\mu$ g/mL de LaAg. A dosagem foi feita por ELISA sanduíche 48 horas após a adição do LaAg. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

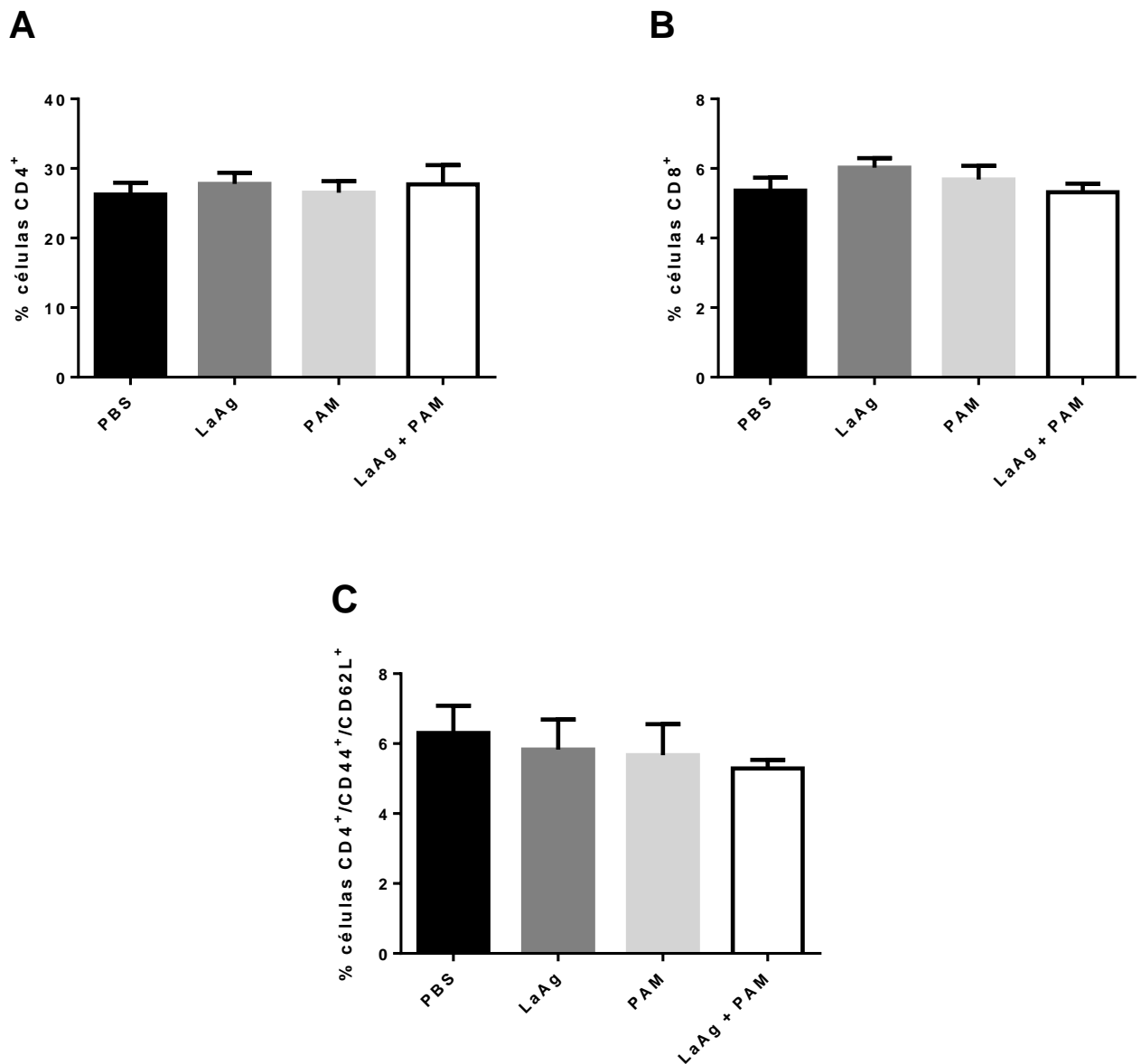
Esplenócitos de animais vacinados com LaAg livre ou associado a PAM apresentaram significativa produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 quando comparado aos grupos PBS ou

PAM (Figura 3A, 3B e 3D). Não foi observado nenhuma diferença na produção de IL-10 pelos esplenócitos dos diferentes grupos (Figura 3C).

### **5.3 Imunidade protetora da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante PAM3CSK4**

Após avaliarmos o potencial imunogênico de LaAg livre ou associado à PAM, nos propusemos a verificar a capacidade protetora da vacina frente ao desafio com *L. infantum chagasi*.

Desta forma, animais foram imunizados de acordo com o protocolo anterior e infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. infantum chagasi*, 7 dias após o booster e eutanasiados 14 dias após o desafio. Após a realização dos protocolos, iniciamos a análise *ex vivo* das populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ totais e de memória no baço.

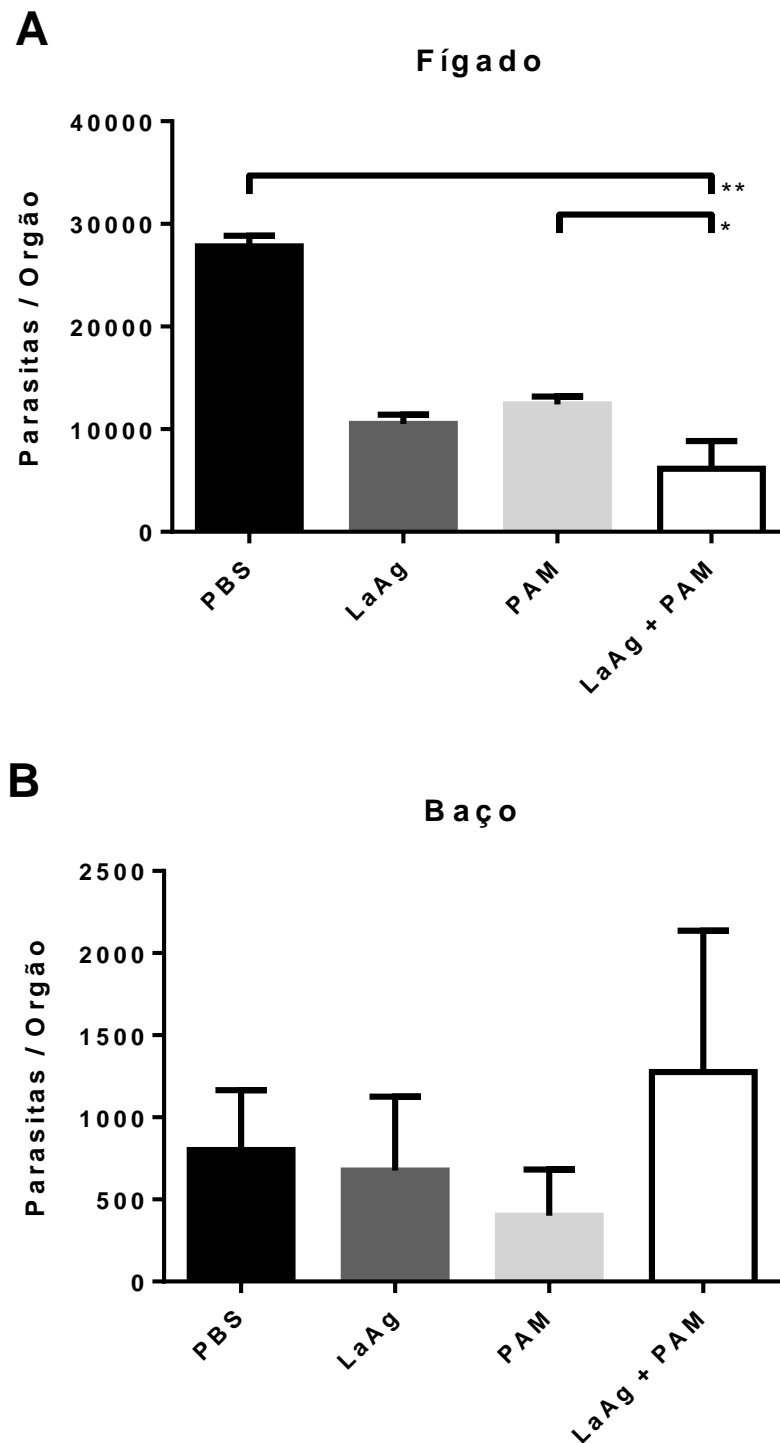


**Figura 4: Efeito da vacinação na população de células T no baço.** Análise da população de linfócitos T em células obtidas do baço de camundongos imunizados de acordo com o protocolo anteriormente citado, desafiados com *L. infantum chagasi*. Células imediatamente obtidas do macerado do baço, foram incubadas com anticorpos anti CD4 (FITC), CD8 (FITC), CD44 (PE) e CD62L (APC) e a fluorescência analisada por FACS. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Células analisadas *ex vivo*, demonstraram que a associação de LaAg/PAM não alterou a frequência de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais e de populações de memória no baço (Figura 4).

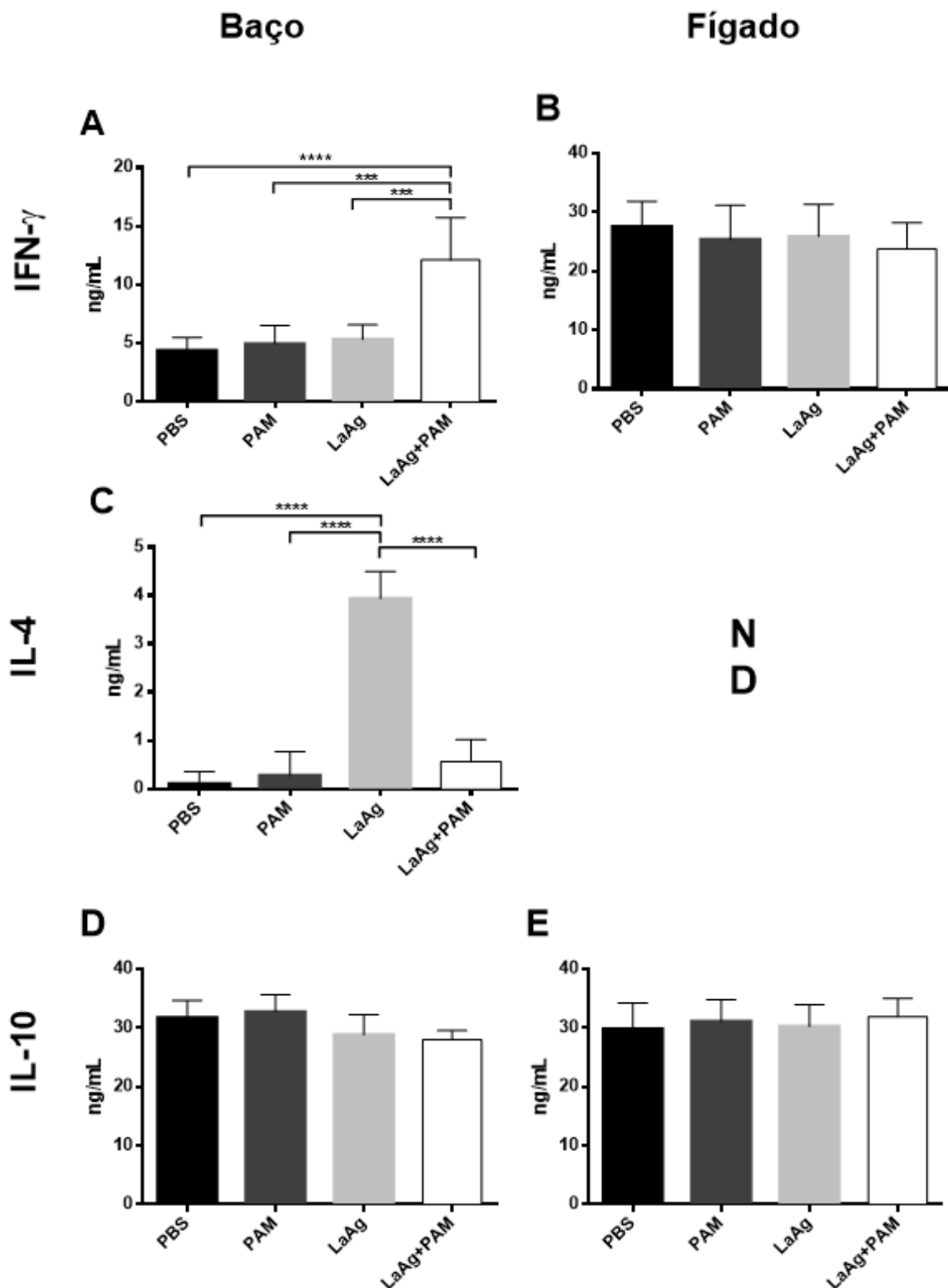
Após a análise das populações de linfócitos nos esplenócitos dos camundongos vacinados e desafiados com *L. infantum chagasi*, determinamos a carga parasitária no baço e fígado.

Desta forma, utilizando método de diluição limitante (LDA), foi observado que a associação de LaAg e PAM foi capaz de promover a redução no parasitismo do fígado dos animais quando comparados ao grupo controle ou ao grupo que somente recebeu o adjuvante PAM. Não houve significância estatística entre os grupos LaAg / LaAg/PAM (Figura 5A). De forma diferente, não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais avaliados quanto a diminuição do parasitismo esplênico (Figura 5B).



**Figura 5: Avaliação do parasitismo de camundongos BALB/c desafiados com *L. infantum chagasi* após imunização.** Avaliação da carga parasitária no baço e fígado de animais imunizados por via intranasal com a associação de LaAg/PAM e desafiados com  $10^7$  promastigotas de *L. infantum chagasi* pela veia caudal, 7 dias após o reforço da vacina. Os animais foram eutanasiados 14 dias após o desafio e avaliação foi feita através do método de diluição limitante (LDA). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

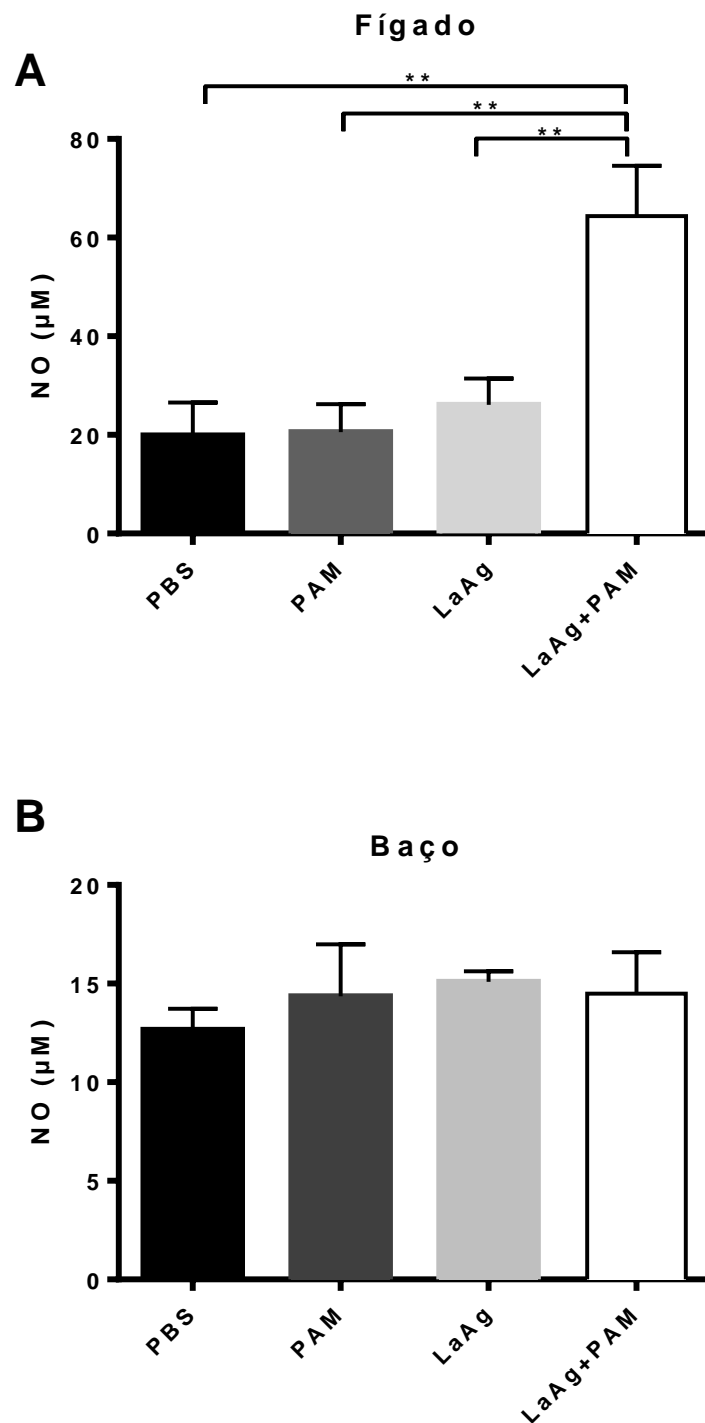
Visto que os animais vacinados com LaAg/PAM apresentaram diminuição no parasitismo hepático, nos propusemos a avaliar os possíveis mecanismos relacionados a esta observação. Desta forma, foi determinada a produção de citocinas nos sobrenadantes dos órgãos infectados, no dia da eutanásia. Os animais vacinados com LaAg/PAM apresentaram aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$ , bem como diminuição da produção de IL-4 no baço, quando comparada ao demais grupos (Figura 6A e 6C). Não foram observadas alterações no perfil de IL-10 do baço dos grupos avaliados (Figura 6D). Não foi observado diferença nas concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-10 encontradas nos sobrenadantes hepáticos entre os grupos avaliados (6B e 6E), bem como não foi detectado a produção de IL-4 nos hepatócitos dos grupos avaliados.



**Figura 6: Produção local de citocinas após o desafio.** Análise da produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL10 no sobrenadante de macerado do baço e fígado, retirados de animais imunizados e desafiados com *L. infantum chagasi*. A produção de citocinas foi determinada por ELISA sanduíche. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Além da produção de citocinas, avaliamos as quantidades de óxido nítrico (NO) produzido nesses órgãos, visto a grande importância desse composto para os mecanismos microbicida. A associação de LaAg e PAM demonstrou aumentar significativamente a quantidade de NO nos hepatócitos quando comparado aos outros grupos (Figura 7A). Não foram encontradas diferenças significativas no sobrenadante dos esplenócitos dos grupos analisados no (Figura 7B).



**Figura 7: Produção local de NO após o desafio.** Análise da produção local de NO no sobrenadante de macerado do baço e fígado, retirados de animais imunizados e desafiados com *L. infantum chagasi*. A produção de NO foi analisada através do método de Griess. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**DISCUSSÃO**

## 6. Discussão

A leishmaniose visceral é a forma mais grave dentre todas as manifestações causadas pelos parasitas do gênero *Leishmania*. Esta doença debilitante pode levar o infectado ao estado de imunossupressão sistêmica, resultando em um elevado risco de morte e um grande impacto na saúde pública, sendo agravada pela negligência das autoridades responsáveis e pela inexistências de novas terapias e métodos profiláticos.

Atualmente, a única maneira de controle e tratamento é através do uso de medicamentos e do controle do inseto vetor. No entanto, o número de drogas disponíveis é limitado e as mesmas são de alto custo, ineficazes e tóxicas, podendo levar ao desenvolvimento de cepas resistentes (Srivastava *et al.*, 2016). Os métodos de controle do vetor, já demonstraram ser ineficientes, agravando ainda mais a situação (González *et al.*).

Até o presente momento, diversas formulações de vacinas são desenvolvidas e testadas, porém os resultados obtidos por estes novos candidatos ainda são insatisfatórios, tornando urgente o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção (De Luca e Macedo, 2016). Dentre os atuais candidatos vacinais, destacamos o uso do LaAg, por demonstrar sua eficácia no desenvolvimento de proteção quando administrado por via de mucosa. Entre estes resultados, podemos citar trabalhos, anteriormente desenvolvidos por nosso grupo, que demonstraram que a administração tanto por via oral (Pinto *et al.*, 2003) quanto por via intranasal (Pinto *et al.*, 2004), foi capaz de desenvolver proteção em modelos experimentais de *L. amazonenses*. Nosso grupo também demonstrou que a associação de LaAg ao adjuvante CAF, frente ao desafio com *L. infantum chagasi* gerou proteção em modelos murinos de leishmaniose visceral (Leal *et al.*, 2015), sendo que sua utilização na obtenção de proteção em hamsters frente ao desafio com *L. (Viannia) braziliensis* também demonstrou ser eficiente (Da Silva-Couto *et al.*, 2015).

No presente trabalho, objetivamos estudar os resultados da associação da vacina administrada por via intranasal composta pelo antígeno total bruto de *L. amazonensis* (LaAg) na forma livre ou associado ao adjuvante Pam3CSK4 contra a infecção murina por *L. infantum chagasi*.

Nosso estudo foi iniciado através da avaliação da hepato e nefrotoxicidade e da imunogenicidade gerada após as imunizações. Para avaliarmos a segurança da vacina livre ou associada ao adjuvante PAM, comparamos os níveis séricos de ALT, AST e creatinina. Essas aminotransferases ALT e AST são amplamente encontradas em muitos

tecidos do corpo e sua liberação na corrente sanguínea ocorre devido a lesão dos tecidos, desta forma, os valores de ALT e AST são corriqueiramente utilizados no monitoramento de lesões cardíacas e hepáticas (Ennulat *et al.*, 2010). Já os níveis de creatinina, estão relacionados a lesões renais, isto ocorre pois, a creatinina liberada na metabolização de tecidos musculares é eliminada através da filtração glomerular, dessa forma, seu acúmulo está relacionado a lesões renais (Adler, 2010). Para validar o teste utilizamos um marcador de toxicidade, dessa forma, um grupo de camundongos recebeu tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e apresentou aumento dos três parâmetros bioquímicos, haja visto o efeito tóxico deste composto, conforme relatam Lee *et al.* (2007). Em nosso modelo experimental, os animais vacinados com as formulações livres ou associadas não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros séricos de ALT, AST e creatinina. Estes dados corroboram com os achados de Leal e colaboradores (2015), que demonstraram a segurança da formulação utilizando o LaAg na forma livre ou em associação com o adjuvante CAF.

Howard *et al.* (1984) afirmou que o sucesso em vacinas humanas e em modelos animais é frequentemente associado à resposta de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH) em resposta a antígenos do parasito, bem como pela capacidade de proliferarem especificamente ao desafio antigênico. Em nossos experimentos, camundongos vacinados com LaAg livre ou associado ao adjuvante, demonstraram respostas DTH mais intensas que os demais grupos. Da mesma forma, a associação de LaAg/PAM foi capaz de prolongar a resposta clássica de DTH com pico em 48h, o que reafirma o potencial papel imunogênico da formulação. De forma adicional, o desenvolvimento da imunidade protetora em doenças parasitárias está diretamente relacionada a resposta celulares T com grande produção de citocinas e respostas do tipo Th1 (Darrah *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstram que linfócitos T estimulados com antígenos de *Leishmania*, demonstram sua multifuncionalidade em produzir diferentes citocinas relacionadas a proteção como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 como um forte indicativo de imunidade protetora (Mougneau *et al.*, 2011; Gannavaram, Bhattacharya, Dey, *et al.*, 2016). Nosso estudo demonstrou que a imunização com LaAg livre ou associado ao adjuvante PAM foi capaz de induzir a produção de níveis altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4.

Os resultados do teste de hipersensibilidade tardio associado aos da produção de citocinas fornecem um indicativo importante da resposta celular T antígeno-específica e do possível sucesso da vacina. Para isso, analisamos o efeito protetor das diferentes

formulações, identificando a porcentagem de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais, assim como a subpopulação de memória (TCD4<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>), tentando determinar o estabelecimento, ou não, da memória imunológica. Embora não tenhamos verificado nenhuma alteração no perfil de células T totais e memória, Chang *et al.* (2014) e Sallusto e colaboradores (2010), afirmam que a memória imunológica é extremamente importante no desenvolvimento da proteção e no sucesso de uma vacina.

Para dar continuidade à análise do efeito protetor, analisamos a carga parasitária no baço e no fígado dos camundongos vacinados e desafiados com *L. infantum chagasi*. Em estudos anteriores do nosso grupo, Leal *et al.* (2015), definiu o pico parasitário desta cepa do protozoário, através de um estudo cinético de infecção. Dessa forma, condicionamos a eutanásia dos animais para duas semana após o desafio com *L. infantum chagasi*, onde era possível observar o maior pico de infecção. A vacinação com LaAg livre ou associado ao adjuvante foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado dos camundongos, mas não no baço. A diminuição do parasitismo no fígado foi também observado após a administração intranasal de LaAg associado ao adjuvante CAF (Leal *et al.*, 2015), ou mesmo em outras formulações com a mesma vacina contra a leishmaniose cutânea (Da Silva-Couto *et al.*, 2015). Este resultado se torna significativo pois, a *Leishmania* possui uma alta afinidade por células do sistema mononuclear fagocitário, o que acaba tornando o fígado extremamente parasitado. Devido a isto a carga parasitária do fígado, acaba se tornando, indiretamente, um marcador de eficácia de proteção (Lima *et al.*, 1997). Wilson e colaboradores (1996) afirma que, a formação de granulomas no baço e no fígado, podem alterar a liberação de fatores de supressão, alterando também a resposta imune T específica. Já foi observado que, o aumento destes granulomas e sua presença em sobrenadantes de culturas, resultaram no aumento da carga parasitária no baço. Dessa forma, há necessidade de um estudo histológico ou de um cultivo de células imunizadas para excluir está alternativa e confirmar os resultados.

Afim de correlacionar um possível mecanismo protetor, determinamos a produção de citocinas nos sobrenadantes dos órgão infectados. Nossos resultados demonstraram que a imunização com LaAg/PAM levou ao aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  e a diminuição drástica dos níveis de IL-4 no baço, porém, não foram encontradas mudanças significativas nas concentrações de citocinas nos sobrenadantes do fígado. O perfil de citocinas encontrado no baço é compatível com respostas do tipo Th1 amplamente correlacionado a eliminação do parasito (Mougneau *et al.*, 2011; Gannavaram,

Bhattacharya, Ismail, *et al.*, 2016). Estudos demonstram que para o desenvolvimento de uma resposta eficaz contra o parasito, necessitamos de uma forte resposta do tipo Th1 (Alexander *et al.*, 1999), desta forma, as concentrações de citocinas encontradas deveriam contribuir para a ativação de macrófagos e para eliminação do protozoário. De forma semelhante a isto, Leal e colaboradores (2015) demonstraram que, o aumento da produção de IFN está diretamente relacionado com a diminuição da carga parasitária no baço e fígado, justificando nossos achados.

Visto que os níveis de citocinas encontrados nos sobrenadantes do baço e do fígado dos animais vacinados não justificava a diminuição ou o aumento na carga parasitária, buscamos outro marcador para tentar explicar esta alteração. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de intermediários reativos de oxigênio (iNO), é um das táticas mais comuns para eliminação de patógenos intracelulares. Isto ocorre pois, o fagossomo, contendo o parasita ativa a NADPH oxidase o que leva a produção de ROS e a explosão respiratória. Neste processo ocorre a produção secundária de óxido nítrico (NO) e a dosagem deste metabolito tem demonstrado ser um ótimo parâmetro de ativação de macrófagos (Lima-Junior *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstram que, a associação de LaAg/PAM foi capaz de induzir altos níveis de NO no fígado quando comparado aos outros grupos, enquanto manteve os níveis de NO próximos ao grupo controle no baço. Esses dados suportam os resultados da carga parasitária e podem explicar em parte a diminuição do parasitismo no fígado, mas não no baço. Leal e colaboradores (2015) e outros trabalhos (Murray, 1982; Liew, Millott, *et al.*, 1990), demonstraram que altos níveis de NO estão relacionados a diminuição do parasitismo e ao desenvolvimento de uma resposta protetora.

**CONCLUSÃO**



## 7. Conclusão

Baseados em nossos resultados, concluímos que a administração nasal de LaAg associada a Pam3CSK4 não apresentou toxidez sistêmica e demonstrou ser um importante candidato vacinal indutor de imunogenicidade em camundongos. Além disto, a vacina LaAg/PAM foi capaz de induzir respostas parcialmente protetoras, que foram importantes para a diminuição do parasitismo no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

## **REFERÊNCIAS**

## 8. Referências

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infect Genet Evol**, v. 28, p. 691-703, Dec 2014. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.028> >.
- ACHARYA, I. L. et al. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of Salmonella typhi. A preliminary report. **N Engl J Med**, v. 317, n. 18, p. 1101-4, Oct 29 1987. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198710293171801> >.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593> >.
- ADLER, S. Novel kidney injury biomarkers. **J Ren Nutr**, v. 20, n. 5 Suppl, p. S15-8, Sep 2010. ISSN 1051-2276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2010.05.005> >.
- AGU, W. E.; FARRELL, J. P.; SOULSBY, E. J. Proliferative glomerulonephritis in experimental Leishmania donovani infection of the golden hamster. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 4, n. 3-4, p. 353-68, 1981. ISSN 0147-9571 (Print)0147-9571. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147957181900217> >.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462516> >.
- ALIPRANTIS, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 736-9, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426996> >.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, v. 136, n. 2, p. 341-8, May 2004. ISSN 0009-9104 (Print)1365-2249 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02426.x> >.
- ARMIJOS, R. X. et al. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. **J Infect Dis**, v. 177, n. 5, p. 1352-7, May 1998. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593024> >.
- ARMIJOS, R. X. Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last? **J Infect Dis**, v. 187, n. 12, p. 1959-61, Jun 15 2003. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/375399> >.

BAUMANN, U. Mucosal vaccination against bacterial respiratory infections. **Expert Rev Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1257-76, Oct 2008. ISSN 1476-0584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.7.8.1257> >.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infect Immun**, v. 76, n. 3, p. 1003-15, Mar 2008. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00611-07> >.

BOMFORD, R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? **Dev Biol Stand**, v. 92, p. 13-7, 1998. ISSN 0301-5149 (Print)0301-5149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554255> >.

BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F. E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunol Rev**, v. 206, p. 32-63, Aug 2005. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x> >.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 8, p. 641-54, Aug 2005. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri1668> >.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 113, 2005. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-5-113> >.

CAMPOS-NETO, A.; BUNN-MORENO, M. M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. **Infect Immun**, v. 38, n. 3, p. 871-6, Dec 1982. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC347829/> >.

CAPRONI, E. et al. MF59 and Pam3CSK4 boost adaptive responses to influenza subunit vaccine through an IFN type I-independent mechanism of action. **J Immunol**, v. 188, n. 7, p. 3088-98, Apr 1 2012. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101764> >.

CARNEIRO, M. B. et al. Short-term protection conferred by Leishvacin(R) against experimental *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice. **Parasitol Int**, v. 63, n. 6, p. 826-34, Dec 2014. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.010> >.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 4144-8, Dec 1985. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4067312> >.

CECILIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Front Immunol**, v. 5, p. 480, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00480> >.

CECÍLIO, P. et al. Deception and Manipulation: The Arms of *Leishmania*, a Successful Parasite. **Front Immunol**, v. 5, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00480> >.

CHANG, J. T.; WHERRY, E. J.; GOLDRATH, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. **Nat Immunol**, v. 15, n. 12, p. 1104-15, Dec 2014. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3031> >.

CHARMOY, M. et al. Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 2, p. 288-99, Aug 2007. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0706440> >.

CHAVAS, J.; GUIMARAES FERRI, R. Immunoglobulins in visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 8, n. 5, p. 225-6, Sep-Oct 1966. ISSN 0036-4665 (Print)0036-4665.

CHEN, Y. et al. [Protective effect of pretreatment with TLR2 agonist Pam3Csk4 on mice challenged by methicillin-resistant Staphylococcus aureus]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 32, n. 2, p. 212-6, Feb 2016. ISSN 1007-8738 (Print)1007-8738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927383> >.

COLER, R. N. et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. **Infect Immun**, v. 75, n. 9, p. 4648-54, Sep 2007. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00394-07> >.

COLER, R. N. et al. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, Leishmania major stress-inducible protein 1, and Leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4215-25, Aug 2002. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117930> >.

DA SILVA-COUTO, L. et al. Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (Mesocricetus auratus) Against Leishmania (Viannia) braziliensis Infection. In: (Ed.). **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, 2015. ISBN 1935-2727 (Print)1935-2735 (Electronic).

DARRAH, P. A. et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 843-50, Jul 2007. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1592> >.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Front Immunol**, v. 7, 2016. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00151> >.

DE LUCA, P. M. et al. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, v. 17, n. 9-10, p. 1179-85, Mar 5 1999. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DOSTALOVA, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 276, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-276> >.

DUMONTEIL, E. et al. Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. **Dev Biol (Basel)**, v. 104, p. 135-41, 2000. ISSN 1424-6074 (Print)1424-6074. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DUPUY, C. et al. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. **J Virol**, v. 73, n. 11, p. 9063-71, Nov 1999. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p. 961-72, Aug 2014. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.4310> >.

ENNULAT, D. et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. **Toxicol Sci**, v. 116, n. 2, p. 397-412, Aug 2010. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq144> >.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v. 101, n. 4, p. 890-8, Feb 15 1998. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci11112> >.

FOLLADOR, I. et al. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**, v. 20, n. 9-10, p. 1365-8, Jan 31 2002. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FUJIHACHI, K.; MCGHEE, J. R. **Th1/Th2/Th3 Cells for regulation of mucosal immunity, tolerance and inflammation. Mucosal Immunology**. Third Edition. Academic Press, 2005. p. 539-58.

GALVAO-CASTRO, B. et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 56, n. 1, p. 58-66, Apr 1984. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GAMBHIR, V. et al. The TLR2 agonists lipoteichoic acid and Pam3CSK4 induce greater pro-inflammatory responses than inactivated *Mycobacterium butyricum*. **Cell Immunol**, v. 280, n. 1, p. 101-7, Nov 2012. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.001> >.

GANNAVARAM, S. et al. Methods to Evaluate the Preclinical Safety and Immunogenicity of Genetically Modified Live-Attenuated *Leishmania* Parasite Vaccines. **Methods Mol Biol**, v. 1403, p. 623-38, 2016. ISSN 1064-3745. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7\\_35](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_35) >.

GANNAVARAM, S. et al. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance *Leishmania* Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. **Front Immunol**, v. 7, p. 187, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00187> >.

GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. **J Clin Invest**, v. 92, n. 1, p. 324-9, Jul 1993. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci116570> >.

GHOSE, A. C. et al. Serological investigations on Indian kala-azar. **Clin Exp Immunol**, v. 40, n. 2, p. 318-26, May 1980. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, Mar 11 2016. ISSN 0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071> >.

GOMES, D. C. et al. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2168-72, Mar 8 2007. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.060> >.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The Immune Response to Sand Fly Salivary Proteins and Its Influence on Leishmania Immunity. **Front Immunol**, v. 3, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00110> >.

GONZÁLEZ, U. et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 8, p. 1-101, ISSN 1469-493X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD008736.pub2> >.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 2, p. 687-95, Feb 1998. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4141\(199802\)28:02<687::aid-immu687>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4141(199802)28:02<687::aid-immu687>3.0.co) >.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri978> >.

GROHSKOPF, L. A. et al. Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015-16 Influenza Season. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 64, n. 30, p. 818-25, Aug 7 2015. ISSN 0149-2195. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 16, p. 6748-53, Apr 21 2009. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0900226106> >.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 927-74, 2000. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.927> >.

- GWINN, W. M. et al. A comparison of non-toxin vaccine adjuvants for their ability to enhance the immunogenicity of nasally-administered anthrax recombinant protective antigen. **Vaccine**, v. 31, n. 11, p. 1480-9, Mar 1 2013. ISSN 0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.012> >.
- HAILU, A. et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clin Immunol**, v. 117, n. 2, p. 182-91, Nov 2005. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2005.06.015> >.
- HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, Apr 2005. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1213> >.
- HOWARD, J. G. et al. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. **J Immunol**, v. 132, n. 1, p. 450-5, Jan 1984. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HUANG, L.; HINCHMAN, M.; MENDEZ, S. Coinjection with TLR2 agonist Pam3CSK4 reduces the pathology of leishmanization in mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003546, Mar 2015. ISSN 1935-2727. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003546> >.
- HUGENTOBLER, F. et al. Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection. **Vaccine**, v. 30, n. 39, p. 5726-32, Aug 24 2012. ISSN 0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.004> >.
- IBORRA, S. et al. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3865-76, Sep 28 2004. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.04.015> >.
- ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072> >.
- JAAFARI, M. R. et al. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, v. 25, n. 32, p. 6107-17, Aug 10 2007. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.009> >.
- JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 1, p. 33-40, Mar 2002. ISSN 0166-6851 (Print)0166-6851. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. **Trends Immunol**, v. 22, n. 2, p. 78-83, Feb 2001. ISSN 1471-4906 (Print)1471-4906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.



KAMACHI, K.; KONDA, T.; ARAKAWA, Y. DNA vaccine encoding pertussis toxin S1 subunit induces protection against *Bordetella pertussis* in mice. **Vaccine**, v. 21, n. 31, p. 4609-15, Nov 7 2003. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes Infect**, v. 2, n. 14, p. 1765-73, Nov 2000. ISSN 1286-4579 (Print)1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137049> >.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr Opin Hematol**, v. 7, n. 1, p. 26-31, Jan 2000. ISSN 1065-6251 (Print)1065-6251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KHALIL, E. A. et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 140, n. 2, p. 349-53, May 2005. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02768.x> >.

KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **Faseb j**, v. 19, n. 8, p. 1000-2, Jun 2005. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-3416fje> >.

KUNKEL, E. J.; CAMPBELL, D. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. **Microcirculation**, v. 10, n. 3-4, p. 313-23, Jun 2003. ISSN 1073-9688 (Print)1073-9688. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mn.7800196> >.

LAGE, D. P. et al. Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 37, n. 12, p. 646-56, Dec 2015. ISSN 0141-9838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12287> >.

LANGE, U. G. et al. DNA-Salmonella enterica serovar Typhimurium primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 8, p. 4924-8, Aug 2004. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.8.4924-4928.2004> >.

LARA-SILVA FDE, O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 148, p. 128-36, Aug 2015. ISSN 0001-706x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002> >.

LEAL, J. M. et al. Intranasal vaccination with killed *Leishmania amazonensis* promastigotes antigen (LaAg) associated with CAF01 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice challenged with *Leishmania (infantum) chagasi*. **Parasitology**, v. 142, n. 13, p. 1640-6, Nov 2015. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182015001250> >.

LEE, C. P. et al. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 6, p. 888-95, Jun 2007. ISSN 0278-6915 (Print)0278-6915. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.007> >.

LEE, S. K. et al. Synergistic anticancer effects of Pam3CSK4 and Ara-C on B-cell lymphoma cells. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 13, p. 3485-95, Jul 1 2014. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-2522> >.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-31, Apr 2007. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017> >.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v. 71, n. 4, p. 556-9, Dec 1990. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. **Parasitol Today**, v. 13, n. 2, p. 80-2, Feb 1997. ISSN 0169-4758 (Print)0169-4758. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3221> >.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083> >.

LOMBARDI, V. et al. Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1819-29, Nov 2008. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03056.x> >.

MACPHERSON, G.; KUSHNIR, N.; WYKES, M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. **Immunol Rev**, v. 172, p. 325-34, Dec 1999. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARZOCHI, K. B. et al. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 205-12, Mar-Apr 1998. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARZOCHI, M. C. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 570-80, Sep-Oct 2009. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967242> >.

MAYRINK, W. et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 73, n. 4, p. 385-7, 1979. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAYRINK, W. et al. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of Leishmania. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 2, p. 125-32, Mar-Apr 2002. ISSN 0037-8682 (Print)0037-8682. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003053, Jan 2013. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003053> >.

MESTECKY, J., BLUMBERG, R., KIYONO, H. & MCGHEE, J. R. **Fundamental Immunology 5th edn.** 5. San Diego: Academic, 2013.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 747-54, Mar 7 2005. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041470> >.

MOINGEON, P. Adjuvants for allergy vaccines. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 10, p. 1492-8, Oct 2012. ISSN 2164-5515. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/hv.21688> >.

MOMENI, A. Z. et al. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 466-72, Feb 5 1999. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOREIRA, M. L. et al. Vaccination against canine leishmaniosis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. **Vet Parasitol**, v. 220, p. 33-45, Apr 15 2016. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.009> >.

MORENO, J. et al. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1683, 2012. ISSN 1935-2727. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001683> >.

MORENO, J. et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 158, n. 3-4, p. 199-207, Apr 15 2014. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.011> >.

MOUGNEAU, E. et al. Expression cloning of a protective Leishmania antigen. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 563-6, Apr 28 1995. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 286-96, Mar 2011. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x> >.

MURRAY, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J Immunol**, v. 129, n. 1, p. 351-7, Jul 1982. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NGUYEN, D. T. et al. The synthetic bacterial lipopeptide Pam3CSK4 modulates respiratory syncytial virus infection independent of TLR activation. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 8, p. e1001049, 2010. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001049> >.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, Nov 2014. ISSN 0163-4453. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016> >.

PINTO, E. F.; DE MELLO CORTEZIA, M.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, n. 25-26, p. 3534-41, Sep 8 2003. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PINTO, E. F. et al. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. **Infect Immun**, v. 72, n. 8, p. 4521-7, Aug 2004. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.8.4521-4527.2004> >.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 111-29, 2015. ISSN 1746-0913. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.103> >.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **J Immunol**, v. 145, n. 12, p. 4311-6, Dec 15 1990. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp Parasitol**, v. 85, n. 3, p. 283-95, Mar 1997. ISSN 0014-4894 (Print)0014-4894. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1996.4139> >.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, Mar 18 2016. ISSN 0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019> >.

REMALEY, A. T. et al. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub> production. **J Biol Chem**, v. 259, n. 18, p. 11173-5, Sep 25 1984. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3988-94, Sep 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002536, Feb 2012. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002536> >.

SALLUSTO, F. et al. From Vaccines to Memory and Back. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 451-63, Oct 29 2010. ISSN 1074-7613 (Print)1097-4180 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.008> >.

SANTOS, J. L. et al. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. **J Interferon Cytokine Res**, v. 26, n. 9, p. 682-8, Sep 2006. ISSN 1079-9907 (Print)1079-9907. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2006.26.682> >.

SANTOS, W. R. et al. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, n. 1-2, p. 30-43, Nov 22 2002. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SARKAR, A. et al. Infection of neutrophil granulocytes with Leishmania major activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Med Microbiol Immunol**, v. 202, n. 1, p. 25-35, Feb 2013. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-012-0246-1> >.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. **J Exp Med**, v. 178, n. 2, p. 567-77, Aug 1 1993. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SCHEIERMANN, J.; KLINMAN, D. M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. **Vaccine**, v. 32, n. 48, p. 6377-89, Nov 12 2014. ISSN 0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.065> >.

SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. In: (Ed.). **J Exp Med**, v.204, 2007. p.893-906. ISBN 0022-1007 (Print)1540-9538 (Electronic).

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **Faseb j**, v. 9, n. 9, p. 726-35, Jun 1995. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SILVESTRE, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OUAISSI, A. Live attenuated Leishmania vaccines: a potential strategic alternative. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 56, n. 2, p. 123-6, Mar-Apr 2008. ISSN 0004-069X (Print)0004-069x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-008-0010-9> >.

SKEIKY, Y. A. et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3292-303, Sep 10 2002. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SPATH, G. F. et al. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. **Science**, v. 301, n. 5637, p. 1241-3, Aug 29 2003. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1087499> >.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. In: (Ed.). **Parasit Vectors**, v.9, 2016. ISBN 1756-3305 (Electronic).

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Curr Mol Med**, v. 4, n. 6, p. 667-79, Sep 2004. ISSN 1566-5240 (Print)1566-5240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. In: (Ed.). **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, 2002. p.951-8. ISBN 1071-412X (Print)1098-6588 (Electronic).

SUNDAR, S. et al. Treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 6, n. 16, p. 2821-9, Dec 2005. ISSN 1465-6566. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.6.16.2821> >.

SUNDAR, S. et al. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 176, n. 4, p. 1117-9, Oct 1997. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SVANHOLM, C. et al. Protective DNA immunization against *Chlamydia pneumoniae*. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 4, p. 345-53, Apr 2000. ISSN 0300-9475 (Print)0300-9475. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TANDRUP SCHMIDT, S. et al. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 1, 2016. ISSN 1999-4923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics8010007> >.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. 2005-12-15 2005. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/175/12/8346.long> >.

TENG, M. W. et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. **Nat Med**, v. 21, n. 7, p. 719-29, Jul 2015. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3895> >.

TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, n. 13, p. 2409-16, Mar 20 2006. ISSN 0264-410X (Print)0264-410x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.058> >.

TRACH, D. D. et al. Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. **Lancet**, v. 349, n. 9047, p. 231-5, Jan 25 1997. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TUWAIJRI, A. S. A.; MOFLEH, I. A. A.; MAHMOUD, A. A. Effect of Leishmania major on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro. 1990/07/01 1990. Disponível em: < <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-32-3-189> >.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J Immunol**, v. 173, n. 11, p. 6521-5, Dec 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VELEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a killed Leishmania (L.) amazonensis vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 698-703, Nov-Dec 2000. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VELEZ, I. D. et al. Failure of a killed Leishmania amazonensis vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 99, n. 8, p. 593-8, Aug 2005. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.04.002> >.

VINET, A. F. et al. The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000628, Oct 2009. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000628> >.

VON STEBUT, E. et al. Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **J Exp Med**, v. 188, n. 8, p. 1547-52, Oct 19 1998. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WEINER, D. B.; KENNEDY, R. C. Genetic vaccines. **Sci Am**, v. 281, n. 1, p. 50-7, Jul 1999. ISSN 0036-8733 (Print)0036-8733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WERNECK, G. L.; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, R. D. J., BRASIL. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 04/2010 2010. ISSN 0102-311X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2010000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2010000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >

WHO. **Leishmaniasis: WHO report 2012**. World Health Organization. 2012

WILSON, M. E. et al. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of Leishmania chagasi. **J Immunol**, v. 156, n. 6, p. 2231-9, Mar 15 1996. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WU, S. et al. Construction and immunogenicity in mice of attenuated Salmonella typhi expressing Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C. **J Biotechnol**, v. 83, n. 1-2, p. 125-35, Sep 29 2000. ISSN 0168-1656 (Print)0168-1656. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

XU, D.; LIEW, F. Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. **Immunology**, v. 84, n. 2, p. 173-6, Feb 1995. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZANIN, F. H. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infect**, v. 9, n. 9, p. 1070-7, Jul 2007. ISSN 1286-4579 (Print)1286-4579. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.012> >.

ZHAORI, G.; SUN, M.; OGRA, P. L. Characteristics of the immune response to poliovirus virion polypeptides after immunization with live or inactivated polio vaccines. **J Infect Dis**, v. 158, n. 1, p. 160-5, Jul 1988. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.