



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

**JANINE MIRANDA LEAL**

**POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO PROTETOR E DA MEMÓRIA  
IMUNOLÓGICA PELA UTILIZAÇÃO DO ADJUVANTE CAF01  
ASSOCIADO A ANTÍGENOS TOTAIS DE *Leishmania amazonensis*  
(LaAg) PELA VIA INTRANASAL CONTRA A LEISHMANIOSE  
VISCERAL MURINA**

**Vitória**

**2014**

JANINE MIRANDA LEAL

**POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO PROTETOR E DA MEMÓRIA  
IMUNOLÓGICA PELA UTILIZAÇÃO DO ADJUVANTE CAF01  
ASSOCIADO A ANTÍGENOS TOTAIS DE *Leishmania amazonensis*  
(LaAg) PELA VIA INTRANASAL CONTRA A LEISHMANIOSE  
VISCERAL MURINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Vitória

2014

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

---

Leal, Janine Miranda, 1986-

L433p      Potencialização do efeito protetor e da memória imunológica pela utilização do adjuvante CAF01 associado a antígenos totais de *Leishmania amazonensis* (LaAg) pela via intranasal contra a Leishmaniose visceral murina / Janine Miranda Leal. – 2014.

82 f. : il.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

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

1. Memória Imunológica. 2. Administração Intranasal.  
3. Leishmaniose Visceral. I. Gomes, Daniel Cláudio de Oliveira.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



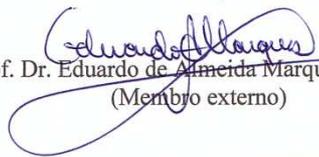
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

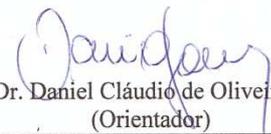
A mestranda JANINE MIRANDA LEAL apresentou a dissertação intitulada **“Potencialização do efeito protetor e da memória imunológica pela utilização do adjuvante CAF01 associado a antígenos totais de *Leishmania amazonenses* (LaAg) pela via intranasal contra a Leishmaniose visceral murina”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (  ) **aprovar** (  ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica JANINE MIRANDA LEAL a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 11 de julho de 2014

  
Prof. Dr. Eduardo de Almeida Marques da Silva  
(Membro externo)

  
Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues  
(Membro interno)

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

*Aos meus pais,*

*Ronaldo e Janete, pessoas que mais amo nesse mundo dedico essa conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço sobre tudo e todos a Deus, pela vida que me concedeu, por me guiar e me guardar todos os dias, por me dar condições de lutar e vencer os muitos obstáculos que enfrentei ao longo do caminho para que pudesse chegar até aqui e pelas pessoas especiais que colocou no meu caminho.

Aos meus pais, pelo esforço para que eu tivesse a melhor formação possível, que sempre e sempre me apoiaram e acreditaram em mim, nunca questionaram minhas escolhas e me amaram incondicionalmente.

Obrigada mamãe pelas orações, por sofrer minhas dores e estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, minha vida não teria sentido sem você! Obrigada papai por todas as madrugadas que foi no meu quarto me avisar que horas eram e que eu tinha que parar de estudar para ir dormir. Vocês são o melhor presente que Deus me deu nessa vida.

Ao meu irmão, por cuidar da sua irmãzinha querida e por torcer por mim, te amo demais da conta.

Aos meus familiares, em especial minha vovozinha querida e à titia Márcia, porque sempre que eu ligava ela aparecia para a gente conversar um pouco e me distrair.

Ao meu amigo de sempre, Emanuel, por acreditar em mim quando eu achava que não seria possível, por vibrar com minhas vitórias, pelo apoio emocional e pela célebre frase quando eu já estava cansada de tudo... “No final sempre dá certo, se não deu certo, foi porque ainda não chegou o fim”...

Ao meu querido orientador, Dani, que me aceitou no laboratório, sentou comigo na bancada e me ensinou a amar a ciência. Agradeço aos conhecimentos passados, à orientação, aos puxões de orelha e por acreditar em mim e no meu potencial.

Obrigada aos professores que participaram da banca, pela disponibilidade e por toda a contribuição para enriquecimento do trabalho.

Agradeço à Luciana, por toda ajuda que me deu, e que não foi pouca! E ao Lorenzo por sempre me salvar com os programas que eu não sabia usar/instalar e pela formatação da dissertação.

Agradeço à Marcelle que esteve comigo desde o início do mestrado, e também à Nataly, Glênia e Priscila, obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntas, pelas apreensões em conjunto sempre que Daniel dizia que queria conversar e pelas muitas e muitas gargalhadas dadas no laboratório, e aos alunos novos Emanuel, Estevão e Bruna vocês são a melhor equipe de laboratório que eu poderia escolher.

A todos do laboratório de Imunologia Molecular e Celular pela amizade, discussões e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos do NDI, sem os quais os dias no laboratório não teriam sido os mesmos.

Aos amigos da turma do mestrado, pelos estudos em grupo para passar em patologia, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Agradeço às funcionárias do NDI Rose, Ariany e Lau pelo carinho.

Agradeço as agências de apoio e financiamento: Capes, Fapes e CNPq.

E meu agradecimento especial, a todos os camundongos utilizados nesse trabalho, sem os quais nada disso seria possível.

*“Preferi a ciência ao fino ouro, pois a Sabedoria vale mais que as pérolas e jóia  
alguma pode igualá-la”.*  
(Prov 8: 10-11)

## RESUMO

O dimetil dioctadecil amônio (DDA) é um composto quaternário de amônio, formado por um lípido anfifílico sintético ligado a duas cadeias hidrofóbicas de alquilo de 18 carbonos, que apresenta efeito adjuvante, promovendo respostas imunes humoral e celular contra diversos agentes patogênicos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e *Chlamydia trachomatis*. No presente trabalho, nós investigamos a capacidade do adjuvante CAF associado a antígenos totais de *Leishmania amazonenses* (LaAg) em induzir respostas imunogênicas e protetoras em infecção por *L. chagasi*. Assim, camundongos BALB/c foram imunizados por via intranasal com 25 µg de LaAg livre ou associado a 150 µg de CAF em 2 doses intervaladas por 15 dias. A dosagem de transaminases e creatinina no soro dos animais demonstraram a biocompatibilidade e segurança da associação LaAg/CAF. Além disso, observamos significantes produções de IFN-γ e NO por esplenócitos estimulados com antígenos do parasito, além de significantes respostas linfoproliferativas e maior percentagem de células de memória (TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>). Níveis aumentados de IgG total e das subclasses específicas (IgG1 e IgG2a) também foram observadas no grupo vacinado com LaAg associado ao CAF, quando comparados com os controles. De forma semelhante, camundongos vacinados com a formulação e desafiados 15 dias após o reforço com *L. chagasi*, apresentaram uma significativa diminuição da carga parasitária no baço e no fígado, associada a uma maior produção de IFN-γ e respostas linfoproliferativas significativamente aumentadas. Juntos, nossos dados demonstraram pela primeira vez viabilidade da vacinação intranasal com LaAg associado ao CAF, como um efetivo mecanismo para a vacinação contra a leishmaniose visceral.

Palavras chave: *L. chagasi*, imunização intranasal, LaAg, CAF, resposta imune.

## ABSTRACT

The dimethyldioctadecylammonium (DDA) is a quaternary ammonium compound formed by a synthetic amphiphilic lipid comprising a hydrophilic positively charged dimethylammonium head-group attached to two hydrophobic 18-carbon alkyl chains (tail), that has previously been reported for eliciting cell-mediated and humoral responses against pathogens like *Mycobacterium tuberculosis* and *Chlamydia trachomatis*. In the present study, we investigated the ability of CAF adjuvant associated with surface antigens of *Leishmania amazonensis* (LaAg) to induce immunogenic and protective responses in challenge against *L. chagasi*. So, BALB/c mice were vaccinated by intranasal route with 2 doses of LaAg (25 µg) or LaAg associated with CAF (150 µg) intercalated by 15 days. The measurement of transaminases and creatinine in the animals sera demonstrated the biocompatibility and safety of the LaAg/CAF combination. Besides, IFN-γ and NO produced by splenocytes after LaAg *in vitro* recall was significantly increased, beyond significantly lymphoproliferative responses and increase of memory cells (TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) percentage. Increased IgG and specific subclasses (IgG1 and IgG2a) in sera levels were also observed in mice vaccinated with LaAg associated with CAF when compared to controls. Similarly, animals vaccinated with this formulation and challenged with *L. chagasi* 15 days after the booster with *L. chagasi* showed a significant decrease in parasite load in the spleen and liver, associated with increased production of IFN-γ and increased lymphoproliferative responses. Together, our results demonstrate for the first time the feasibility of intranasal vaccine with LaAg/CAF as a effective mechanism for the vaccination against visceral leishmaniasis.

Keywords: *L. chagasi*, intranasal immunization, LaAg, CAF, immune response.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diluição seriada 1:2 para análise da carga parasitária. 40
- Figura 2: Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5. A. Seleção de células CD4+, por meio dos parâmetros tamanho versus fluorescência relativa detectada por FL1. B. Quantificação dos eventos de células T de memória mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL3 versus FL4. 43
- Figura 3: Cinética de crescimento de *L. chagasi* PP75 em meio de cultura Grace's suplementado, pH 6,8. A cultura foi iniciada com uma concentração de  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL e mantida em estufa a 24°C durante 7 dias. Diariamente foi retirada uma alíquota para contagem das Leishmanias e determinação da concentração cultura. 47
- Figura 4: Cinética de Infecção. Camundongos BALB/c infectados em veia caudal com 107 *L. chagasi* foram sacrificados semanalmente para que se pudesse determinar a cinética de infecção e o pico parasitário no baço (A) e fígado (B). 48
- Figura 5: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante CAF. Dosagem de transaminases AST (A), ALT (B) e creatinina (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle positivo CCl4. 49
- Figura 6: Análise ex vivo das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4+ (A) e TCD8+ (B) totais e de memória TCD4+ CD44+ CD62L+ (C) e TCD8+ CD44+ CD62L+ (D) em linfonodos cervicais, 24 horas após a segunda dose das formulações vacinais. O resultado representa a média de três experimentos. 50
- Figura 7: Efeito da vacinação intranasal na resposta linfoproliferativa. Esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF bem como o adjuvante sozinho, foram coletados 24 horas após o booster, marcados com CFSE e reestimulados in vitro com 50 µg/mL de LaAg por 96 horas. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa em índice de proliferação celular (IP). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação aos controles. 51
- Figura 8: Efeito da vacinação intranasal sobre a produção de IFN-γ e NO. Produção de IFN-γ (A) e NO (B) em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com LaAg livre ou associado ao CAF e com adjuvante sozinho em 2 doses intervaladas por 14 dias. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o reforço para retirada de esplenócitos que foram posteriormente reestimulados in vitro com 50 µg/mL de LaAg. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche e a de NO pelo método de Griess 96hs após a

reestimulação. O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles não estimulados.

52

Figura 9: Análise das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das populações de linfócitos TCD4+ (A) e TCD8+ (B) totais e de memória TCD4+ CD44+ CD62L+ (C) em esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou asso associado ao CAF bem como o adjuvante sozinho, coletados 24 horas após o booster e reestimulados in vitro com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LaAg por 96 horas. O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação aos controles.

53

Figura 10: Análise da população de linfócitos TCD4+ e TCD8+ produtores de IFN- $\gamma$  e IL-10. Baço de animais eutanasiados 1 dia após o reforço e reestimulados in vitro com LaAg por 96 horas foram avaliados para definir a porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4+ produtores de IL-10 (A) e IFN- $\gamma$  (C) e de linfócitos TCD8+ produtores de IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (D) por citometria de fluxo. O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle PBS. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle interno. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle PBS. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação aos controles interno e PBS.

54

Figura 11: A vacinação com LaAg promove a produção de anticorpos específicos. Produção de Ac anti-Leishmania no soro de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com PBS, LaAg, LaAg associado ao CAF ou CAF em duas doses intervaladas por 14 dias e eutanásia 24 horas após o booster. A dosagem de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) foi determinada por Elisa. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo PBS e ao grupo CAF.

55

Figura 12: Análises ex vivo das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4+ (A) e TCD8+ (B) totais e de memória TCD4+ CD44+ CD62L+ (C) e TCD8+ CD44+ CD62L+ (D) no baço de animais, 15 dias após a infecção com *L. chagasi*. O resultado representa a média de três experimentos.

56

Figura 13: Avaliação das respostas linfoproliferativas após infecção com *L. chagasi*. Resposta linfoproliferativa de esplenócitos marcados com CFSE e reestimulados com LaAg in vitro de camundongos BALB/c sacrificados 15 dias após a infecção com *L. chagasi*. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa em índice de proliferação celular (IP). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles.

57

Figura 14: Efeito da vacinação intranasal sobre a produção de IFN- $\gamma$  após desafio in vivo. Produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com LaAg livre ou associado ao CAF ou com adjuvante livre e desafiados com *L. chagasi* 2 semanas após o reforço. Os animais foram eutanasiados 15 dias após o desafio para retirada de esplenócitos que foram posteriormente reestimulados in vitro com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LaAg. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche. O resultado representa a média de

três experimentos. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles não estimulados.

58

Figura 15: Avaliação da resposta humoral. Dosagem de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) por Elisa no soro dos animais do grupo controle e vacinados com duas doses da vacina LaAg livre ou associada ao CAF pela via intranasal, 15 dias após o desafio (imunidade protetora). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo PBS e ao grupo CAF.

59

Figura 16: Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* após imunização. Número de parasitas no fígado e baço de animais imunizados por via intranasal em duas doses intervaladas por 7 dias. Os animais foram infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. chagasi* em veia caudal 7 dias após a 2ª dose da imunização e eutanasiados 2 semanas após a infecção. A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (LDA). O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo CAF. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle PBS. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controle PBS e LaAg.

60

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Grupos de camundongos e doses das imunizações:

40

## LISTA DE SIGLAS

Ag – Antígeno

ALT – Alanina aminotransferase

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 a ácido hialurônico e medeia a adesão de leucócitos

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

CFSE - *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester*

CpG-ODN - Sequência de repetições de citosina-guanina

CR1 – Receptor de complemento 1

CR3 - Receptor de complemento 3

CXCL1 – Quimiocina que recruta neutrófilo

CDs – Células Dendríticas

Células NK – Células *natural killers*

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

DDA - Dimetil dioctadecil amônio

D-MEM - Dulbecco's minimal essential médium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FML - Ligante de fucose e manose

gp63 - Glicoproteína de 63 kDa

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

IFN – α - Interferon alfa

IFN – β - Interferon beta

IFN – γ - 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

LMA - *L. major* autoclavada

LPG - Lipofosfoglicano

LV – Leishmaniose visceral

MCP-1 – Quimiocina que ativa macrófagos

mL- Mililitro

μL- Microlitro

MPL - Monofosforil lipídico

NALT - tecido linfoide associado à nasofaringe

NO- Óxido nítrico

ORFF - open-reading frame

PBS- Salina tamponada com fosfato

PRRs – Receptor de reconhecimento padrão

PtdSer - Fosfatidil serina

RACKs - Receptores de proteína quinase C ativada

SFB – Soro fetal bovino

T CD4<sup>+</sup>- Linfócito T auxiliar

T CD8<sup>+</sup>- Linfócito T citolítico

TDB - trealose 6,6'-dibeenato

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>19</b>
1.1. Leishmanioses.....	19
1.2. Epidemiologia .....	19
1.3. Etiopatogênese.....	20
1.4. Resposta imune na leishmaniose visceral.....	21
1.5. Vacinas.....	24
1.6. Vacinas de mucosa .....	27
1.7. Adjuvantes.....	30
1.8. Adjuvante CAF01.....	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. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1. Preparação do antígeno total bruto .....	38
4.2. Cinética de crescimento de <i>L. chagasi</i> .....	38
4.3. Animais.....	38
4.4. Parasitos para infecção .....	39
4.5. Cinética da infecção de camundongos BALB/c por <i>L. chagasi</i> .....	39
4.6. Imunização intranasal.....	40
4.7. Dosagem de transaminases (ALT e AST) e Creatinina.....	41
4.8. Obtenção de leucócitos de baço e linfonodos .....	41
4.9. Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	42
4.10. Dosagem de NO.....	43
4.11. Proliferação .....	43
4.12. Dosagem de citocinas .....	44
4.13. Dosagem de classes e subclasses de imunoglobulinas.....	44
4.14. Determinação da carga parasitária.....	45
4.15. Análise Estatística .....	45

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1. Cinética de crescimento .....	47
5.2. Cinética da infecção .....	47
5.3. Biocompatibilidade da vacina LaAg livre ou associada ao CAF <i>in vivo</i> .....	48
5.4. Imunogenicidade da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante CAF....	49
5.5. Imunidade Protetora .....	55
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## **Introdução**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças que tem como agente etiológico várias espécies de protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas não letais até a forma visceral, fatal em casos onde não há tratamento (CONVIT J *et al*, 1972; GRIMALDI G *et al*, 1993).

Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, podemos agrupar as leishmanioses em Leishmaniose Tegumentar (subdividida em cutânea simples, cutânea difusa e mucocutânea) e Leishmaniose Visceral (LV), a qual é o foco do nosso estudo. A Leishmaniose visceral ou calazar é a forma mais grave da doença e apresenta um amplo espectro clínico, que pode variar desde manifestações discretas (oligossintomáticas) e moderadas, até às graves. Os parasitos causadores da doença apresentam tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear, por isso são encontrados parasitando órgãos ricos nestes tipos celulares como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides. Esses parasitos podem permanecer incubados de forma assintomática durante meses ou anos, tempo necessário para que os mesmos se disseminem pelo corpo (OLIVA A *et al*, 2006). Pacientes apresentam como quadro clínico comum: febre de longa duração, aumento do fígado e baço (hepatoesplenomegalia), perda de peso, fraqueza, redução da força muscular, anemia entre outras. As espécies mais comuns causadoras da LV são a *L. chagasi* (*syn L. infantum*) e *L. donovani*. (ANVISA, 2007; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2006).

## 1.2. Epidemiologia

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, e estão entre as infecções causadas por protozoário de maior relevância após a malária e a quinta doença infecto-parasitária de maior importância em todo mundo (WHO, 2009). A doença possui uma ampla distribuição mundial, em 98 países é endêmica, o que coloca mais de 350 milhões de pessoas no grupo de risco (PAHO, 2013). Acredita-

se que hoje existam 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e que a cada ano mais 2 milhões de novos casos surjam, sendo cerca de 500.000 de LV (WHO, 2009). De todos os casos notificados de LV mundialmente, mais de 90% se concentram em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Nepal, Brasil e Etiópia (WHO, 2012).

A LV possui destaque no Continente Americano, onde foi reportada em mais de 10 países. No período de 2001 a 2011 foram relatados 38.808 casos. Destes, 96,6% ocorreram no Brasil (PAHO, 2013). Hoje a doença atinge as cinco regiões brasileiras, sendo o Nordeste a região mais acometida, com destaque para os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2010).

Quanto ao estado do Espírito Santo, houve registro de cinco casos em 2009, com um coeficiente de incidência de 0,1 casos por 100.000 habitantes. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2011).

### **1.3. Etiopatogênese**

O parasito durante seu ciclo de vida e passagem por seus hospedeiros, alterna seu estágio de desenvolvimento em duas formas principais, com características morfológicas distintas para que possa se adaptar aos diferentes ambientes. A forma amastigota é encontrada no vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado. Já a forma promastigota está presente no trato digestivo do inseto vetor (AWASTHI A *et al*, 2004).

Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da família Psychodidae, e gêneros *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*, no Novo e Velho Mundo, respectivamente (FERRO C *et al*, 1995; Rogers KA & TITUS RG, 2003). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*.

A transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados é feita quando fêmeas de insetos vetores infectadas realizam o repasto sanguíneo injetando intradermicamente, junto com sua saliva, formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (ROGERS ME *et al*, 2002). A transmissão é facilitada, pois durante a infecção há a inoculação de moléculas da saliva dos insetos como o maxadilan, a apirase e a hialuronidase (LERNER EA *et al*, 1992; RIBEIRO J *et al*, 1995;

BASANOVA AV *et al*, 2002; RIBEIRO J *et al*, 2000), e também moléculas derivadas do parasito como filamentos proteofosfoglicanos (fPPG) (ROGERS ME *et al*, 2004). Essas moléculas reduzem a exposição dos promastigotas ao sistema imune do hospedeiro aumentando a quimiotaxia de macrófagos para o local da inoculação, acelerando a fagocitose dos parasitas, promovem a inibição da apresentação de antígeno para linfócitos T, a inibição da produção de citocinas Th1, a redução da ativação celular causada pela ação de IFN- $\gamma$  e a regulação negativa da produção de óxido nítrico, NO (ZER R *et al*, 2001).

Após a fagocitose, as formas promastigotas metacíclicas, dentro do vacúolo parasitóforo, se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária até que a quantidade de parasitos dentro do vacúolo leve ao rompimento da célula. As formas amastigotas liberadas podem ser novamente fagocitadas por outras células fagocitárias e estas podem ser ingeridas por um inseto vetor não infectado durante seu repasto sanguíneo (HAWKING F, 1948; HANDMAN E *et al*, 1977). Ao longo do trato digestivo do inseto, essas células ingeridas se rompem liberando as formas amastigotas que se diferenciam em promastigotas e continuam sua multiplicação por divisão binária no vetor. As *Leishmania* migram para a porção anterior da probóscida do inseto, por onde serão, no próximo repasto sanguíneo, inoculadas em outro hospedeiro (ROGERS ME *et al*, 2002).

#### **1.4. Resposta imune na leishmaniose visceral**

A picada do inseto inicia uma resposta inflamatória local que leva ao recrutamento de neutrófilos e monócitos, células importantes no direcionamento e desfecho da infecção (TEIXEIRA CR *et al*, 2005; KAMHAWI S *et al*, 2000; BELKAID Y *et al*, 2000). Os macrófagos recrutados secretam quimioatraentes induzidos pela *Leishmania*, como MCP-1 para monócitos e CXCL1 para neutrófilos, aumentando o influxo de células para o local. (RACOOSIN EL *et al*, 1997).

A captação da *Leishmania* se inicia por meio da interação de receptores presentes na superfície, tanto do patógeno, como lipofosfoglicano (LPG), gp63 e proteofosfoglicanos (YAO C *et al*, 2003; NADERER T *et al*, 2008), quanto da célula do hospedeiro, como o Receptor de Complemento CR1, CR3 (Mac-1), Receptor de Fibronectina e Receptor Manose-Fucose (KANE MM *et al*, 2000), cujos ligantes estão presentes nos macrófagos. Além disso, componentes do patógeno podem ser

reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores tipo Toll (TLRs), levando a maturação e ao tráfico das células dendríticas (CDs) para os linfonodos locais, onde há a apresentação de antígenos para células T virgens, dando início à imunidade adaptativa contra o patógeno invasor (KAISHO T & AKIRA S, 2001; FITZGERALD-BOCARSLY P, 2002).

Os neutrófilos são as células que iniciam a resposta imune contra o patógeno, e em modelo experimental com hamsters, essas células foram encontradas no sítio dermal da infecção cerca de 1h depois da inoculação de promastigotas de *L. donovani* (POMPEU ML *et al*, 1991; BEIL WJ *et al*, 1992). A sobrevivência intracelular da *Leishmania* após a captura por neutrófilos pode ser compatível com a expressão de moléculas derivadas dos patógenos, incluindo LPGs da superfície e fosfatase ácida tartarato-resistente. Essas moléculas podem inibir a fusão do lisossomo, a explosão respiratória e a produção de ânion superóxido em neutrófilos humanos e de camundongos (REMALEY AT *et al*, 1984; AL-TUWAIJRI AS *et al*, 1990; GUEIRARD P *et al*, 2008). Há também o aumento da sobrevivência da *Leishmania* nos neutrófilos por interação da lipoxina A4 com receptores ALX que promove um sinal desativador para essas células (WENZEL A *et al*, 2009). Uma análise *ex-vivo* de neutrófilos recuperados da derme e infectados com *L. major* concluiu que os parasitos aceleraram a apoptose das células por promoverem um aumento da expressão de fosfatidil serina (PtdSer), o que não foi observado em neutrófilos recuperados do mesmo sítio, mas que não continham o parasito (RIBEIRO-GOMES F *et al*, 2012). Além disso, a maioria dos neutrófilos infectados que sofrem lise liberam parasitos viáveis que são, então, captados por outros fagócitos (VAN ZANDBERGEN G *et al*, 2004; GUEIRARD P *et al*, 2008).

As CDs também participam do estabelecimento da resposta imediata, e são potentes células apresentadoras de antígeno que induzem uma eficiente ativação de células T e produzem também citocinas IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  (SCHLEICHER U *et al*, 2007). Essas células podem ser de dois tipos: as mieloides, que exercem efeitos citotóxicos em *L. infantum* por produzirem IL-12 sob a estimulação do receptor TLR 9 e por induzirem células NK a liberarem IFN- $\gamma$ , e as CDs plasmocitoides, que são incapazes de fagocitar os parasitos, mas produzem IL-12 de maneira dependente de TLR 9, sendo também importantes durante a infecção (SCHLEICHER U *et al*, 2007). Estudos de infecção com *Leishmania*, em modelos experimentais e humanos, mostraram que o parasito é capaz de inibir a produção de IL-12 por CDs,

comprometendo a ativação das células NK e, conseqüentemente, a produção de IFN- $\gamma$  e a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 (SCHARTON TM *et al*, 1993).

Os macrófagos são as principais células efetoras na LV. Para o controle da doença, essas células devem ser ativadas por produtos da resposta Th1 e células NK. A citocina mais importante nesse processo é o IFN- $\gamma$ . A produção dessa citocina é regulada pela IL-2 que promove sua estimulação, e IL-10 que é capaz de suprimir sua produção (BACELLAR O *et al*, 2000). O IFN- $\gamma$  estimula os macrófagos a produzirem a óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), uma enzima que catalisa a formação de óxido nítrico (NO) a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina (LIEW FY *et al*, 1990) e que possui extrema importância na toxicidade da *Leishmania*. Outras citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  também estão envolvidas em sua produção por promoveram a ativação de macrófagos e o aumento da expressão da iNOS (BRONTE V *et al*, 2005). Já a sobrevivência da *Leishmania* ocorre quando a ativação de macrófagos é induzida por citocinas do tipo Th2, como a IL-4, IL-10 e IL-13 (GORDON S *et al*, 2003). A IL-10 é uma importante citocina reguladora, ela inibe a explosão respiratória dos macrófagos, a produção de citocinas pró-inflamatórias (KROPF P *et al*, 2005; GORDON S *et al*, 2003) e inibir respostas linfoproliferativas em resposta ao reestímulo com antígenos do parasito (HAILU A *et al*, 2005). A presença dessa citocina está relacionada com a diminuição da capacidade citotóxica de células TCD8<sup>+</sup> e supressão da atividade de células TCD4<sup>+</sup>, influenciando diretamente na capacidade microbicida contra o parasito (RIBEIRO DE JESUS A *et al*, 1998).

Diferente do que ocorre na infecção murina por *L. major*, nenhuma associação entre a resposta imune Th1 e resistência à doença ou da resposta imune Th2 e susceptibilidade tem sido descrita na leishmaniose visceral humana (ANTONELLI LR *et al*, 2004; KHALIL EA *et al*, 2005). Parece possível que exista um padrão misto Th1 e Th2 ativado, conforme revelado pelos níveis elevados de IFN- $\gamma$  e IL-4 detectados em camundongos (GHOSH A *et al*, 2001), ou sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LV causada por *L. donovani* estimuladas *in vitro* com antígenos do parasito. Entretanto, é consenso que a incapacidade de células T em proliferarem e produzirem IFN- $\gamma$  implica no aumento da carga parasitária observada tanto em modelos experimentais quanto na LV humana. Indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por

células TCD4<sup>+</sup> Th2 (CARVALHO EM *et al*, 1985; GHALIB HW *et al*, 1993; SUNDAR S *et al*, 1997). Neste tipo de resposta, há uma maior produção de IL-10 e IL-4 comparado ao IFN- $\gamma$  (KHARAZMI A *et al*, 1999).

A LV em humanos é caracterizada por altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos pacientes (BRAY RS *et al*, 1976; NEOGY AB *et al*, 1987) e ainda não se conhece o papel destes anticorpos na proteção ou patogênese da doença. Em um estudo experimental, foi postulado que a IgG falha em promover a proteção contra o patógeno intracelular além de contribuir para a progressão da doença. Miles e colaboradores (2005) demonstraram que a administração passiva de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em camundongos BALB/c infectados com *L. major* resultou num aumento da lesão provavelmente devido à capacidade dessa imunoglobulina induzir a produção de IL-10 por macrófagos. Neste estudo os animais mais resistentes à infecção foram os que possuíam deficiência na produção de IgG. 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

Atualmente, as opções de tratamento para leishmanioses não são satisfatórias: possuem alta toxicidade, administração parenteral e longos períodos de duração, o que leva o paciente ao abandono do tratamento. Por isso, há a necessidade do desenvolvimento de uma vacina efetiva para prevenção da doença (SUNDAR S *et al*, 2005; RAJEEV N *et al*, 2011). Já foram desenvolvidas várias formulações de vacinas. No entanto, até agora, o resultado final destas, quando testadas em campo, não foram satisfatórios (KEDZIERSKI L *et al*, 2006, VELEZ ID *et al*, 2009).

De forma geral, as vacinas podem ser classificadas em vacinas de primeira, de segunda e de terceira geração. As vacinas de **primeira geração** são aquelas compostas de microrganismos mortos ou atenuados, ou ainda de misturas não caracterizadas de antígenos. A leishmanização, método ainda utilizado em países como o Irã e que consiste na inoculação de promastigotas de *L. major* em locais do corpo normalmente não expostos a fim de evitar o estabelecimento da infecção cutânea em áreas expostas como a face, é um exemplo clássico da utilização de vacina de 1ª geração (BRAY RS *et al*, 2000).

A Leishvacin<sup>®</sup>, outro exemplo de vacina de primeira geração, é constituída de promastigotas mortas de *L. amazonensis* cepa PH8 (MAYRINK W *et al*, 1999; MAYRINK W *et al*, 2002). Essa vacina começou a ser produzida em 1991 pela BioBrás em Montes Claros (MG), objetivando a proteção contra a leishmaniose tegumentar. Durante os estudos clínicos de fase I foi atestada sua segurança (MARZOCHI KBF *et al*, 1998) e nos de fase II sua imunogenicidade (DE LUCA PM *et al*, 1999), mas durante os estudos clínicos de fase III não foi confirmada a eficácia dessa vacina em humanos (VELEZ ID *et al*, 2005), sendo descontinuada a produção. Na Venezuela, Convit e seu grupo (1987) utilizaram *L. major* autoclavada (LMA) + Bacillus *Calmette-Guérin* (BCG) na imunoterapia e/ou imunoquimioterapia da leishmaniose cutânea. No Irã, essa mesma combinação foi testada na proteção contra a leishmaniose cutânea (MOMENI AZ *et al*, 1999; SHARIFI I *et al*, 1998) e no Sudão contra a leishmaniose visceral (KHALIL EAG *et al*, 2000; SATTI IN *et al*, 2001). Os resultados mostraram que essa mistura foi segura, mas com baixa indução da resposta imune protetora, que poderia ser aumentada com o uso de adjuvantes como o alumínio (KENNEY RT *et al*, 1999).

A maioria dos estudos com vacinas se concentram nas formulações de **segunda geração**, que são constituídas por vacinas vivas geneticamente modificadas, subunidades definidas e frações brutas de Ag. A imunização com LACK (proteína homóloga aos Receptores de Proteína Quinase C Ativada (RACKs) apresentou eficácia no modelo de *L. major* protegendo camundongos contra a leishmaniose cutânea (JULIA V *et al*, 1996). Já a vacina Leish-111f, composta por múltiplos componentes (antígenos purificados TSA, LmSTI1 e LeIF) e ainda em fase de ensaios clínicos, se mostrou eficaz contra leishmaniose cutânea e de mucosa, tanto em camundongos, primatas não humanos e humanos (SKEIKY YA *et al*, 2002). A associação com o adjuvante MPL (Leish-111f+MPL-SE) mostrou ser segura e imunogênica em humanos saudáveis durante ensaios clínicos de fase I e II (COLER RN *et al*, 2007). A mesma induziu, em camundongos imunizados não infectados, aumento da produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  por células TCD4<sup>+</sup>, caracterizando uma resposta tipo Th1 (MUTISO MM *et al*, 2013).

As vacinas com *Leishmania* viva atenuada mimetizam o curso da infecção natural (SPORRI R *et al*, 2005), pois apresentam um espectro completo de antígenos e podem induzir uma infecção subclínica e duradoura (FOULDS KE *et al*, 2006). A

habilidade em manipular o genoma da *Leishmania* e criar organismos geneticamente modificados introduzindo ou eliminando genes que podem atenuar o parasito da vacina é considerada uma poderosa alternativa para o desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose (NAGILL R *et al*, 2011). Porém a principal preocupação do uso de vacinas com patógenos atenuados é a segurança da mesma, visto que pode haver uma reversão da virulência ou reativação do patógeno em indivíduos que se tornem imunossuprimidos. Além disso, há também limitações na sua produção em larga escala (SILVESTRE R *et al*, 2008). Dentre as vacinas com subunidades definidas destacam-se as de uso veterinário, que hoje são as únicas vacinas contra leishmaniose liberadas para uso comercial. Uma delas, a Leishmune<sup>®</sup>, tem como antígeno base em sua composição o FML (ligante de fucose e manose) de *L. donovani* e foi licenciada para uso veterinário desde 2005 pelo Ministério da Agricultura (NOGUEIRA FS *et al*, 2005). A Leish-Tec<sup>®</sup> é outra importante vacina comercial de uso veterinário desenvolvida e disponibilizada para a comercialização desde o início de 2009. Formulada utilizando como base a proteína recombinante A2 de *L. donovani*, ela vem demonstrado indução de respostas protetoras em cães e camundongos vacinados (FERNANDES AP *et al*, 2008).

As vacinas de **terceira geração** são as vacinas gênicas, onde genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são inseridos em plasmídeos. Uma série de considerações relativas à segurança das vacinas de DNA deve ser feita, como as possibilidades de integração ao genoma do hospedeiro e de indução de respostas contra as células transfectadas (GURUNATHAN S *et al*, 2000). Também incluídos na categoria de vacinas de 3ª geração estão bactérias e os vírus recombinantes, capazes de codificar antígenos de *Leishmania*. Este é o caso do gene da protease de superfície gp63 de *L. major* expresso em *Salmonella typhimurium* e do vírus vaccinia expressando o gene de gp46/M-2 de *L. amazonensis*, capazes de induzir significantes repostas protetoras contra *L. major* em camundongos (McMAHON-PRATT D *et al*, 1993).

A vacina plasmidial intramuscular codificando o antígeno ORFF (proteína presente nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*) resultou em proteção significativa de camundongos BALB/c contra infecção por *L. donovani* (SUKUMARAN B *et al*, 2003); a imunização intramuscular com gp63-DNA protege camundongos contra *L. mexicana* (ALI SA *et al*, 2009); vacinações com KMP11-DNA (BHAUMIK SK *et al*, 2009) ou o plasmídeo codificando a porção N-terminal de

proteoglicanas de *L. donovani* induzem proteção no desafio contra o parasito (SAMANT M *et al*, 2009). Como vimos, um grande número de vacinas genéticas tem sido empregado em modelos experimentais induzindo proteção contra as diferentes formas de leishmanioses.

### **1.6. Vacinas de mucosa**

As mucosas possuem, entre outras propriedades, a de responder imunologicamente a antígenos de forma local e sistêmica. Por isso hoje há diversos estudos que visam o desenvolvimento de formulações vacinais utilizando estas vias para administração (GOMES DCO *et al*, 2007; AMIN M *et al*, 2009; KANG ML *et al*, 2009). Atualmente, vacinas mucosas já são licenciadas para o uso em humanos e têm demonstrado sucesso considerável na prevenção de doenças, como a diarreia causada pelo *Rotavirus* (MADHI SA *et al*, 2009; VESIKARI T *et al*, 2006), a gripe causada pelo vírus *Influenza* e a cólera causada pelo *Vibrio colerae* (SHIN S *et al*, 2011).

Dentre as mucosas, a nasal possui destaque nas pesquisas como local de entrega de antígenos, por apresentar significante área superficial disponível para absorção dos mesmos (ALHALAWEH A *et al*, 2009), alta vascularização do epitélio (ZHANG X *et al*, 2008), presença de tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT) (BRANDTZAEG P *et al*, 2010) e alta resposta imunológica (AMIN M *et al*, 2009). Esses fatores possibilitam a administração de uma menor dose de antígenos comparada com a vacina oral (KANG ML *et al*, 2009), diminuindo assim a probabilidade de uma reação inflamatória.

A vacinação intranasal estimula resposta imune no NALT e é efetiva na indução da imunidade sistêmica, imunidade da mucosa gástrica e dos tratos genital e respiratório (BRANDTZAEG P *et al*, 2011; JABBAL-GILL I, 2010). No tecido linfoide nasal estão presentes todas as células imunocompetentes necessárias para a resposta imune da mucosa como as células M, linfócitos B e T e células dendríticas (KIYONO H *et al*, 2004).

As células M estão localizadas na superfície da mucosa e são responsáveis pelo transporte de substâncias presentes no lúmen para as concavidades, onde estão as células dendríticas, macrófagos e linfócitos (TAKAHASHI I *et al*, 2009). Os linfócitos T reconhecem os antígenos a eles apresentados pelas células apresentadoras de

antígenos e também promovem a ativação e a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, os quais produzem anticorpos como IgG e IgA, que serão liberados na superfície da mucosa (FUJIHACHI K *et al*, 2005).

No processo de resposta imune da mucosa a interação entre o antígeno e as células dendríticas leva a liberação de citocinas, como a IL-4, IL-10 e IL-12 e também NO e TNF- $\alpha$  que migram para o NALT provocando a maturação dos linfócitos T CD4 Th0 ali presentes tanto para Th1, em presença de IL-12 quanto para Th2, em presença de IL-4 (FUJIHACHI K *et al*, 2005; KELSALL B *et al*, 2005; LEFRANÇOIS L *et al*, 2005). As citocinas liberadas pelos linfócitos Th2 (IL-5 e TGF- $\beta$ ) atuam nas células B promovendo a mudança de classe das imunoglobulinas na superfície de IgM para IgA e também induzindo a proliferação e diferenciação desses linfócitos B em células plasmáticas secretoras de IgA, (FUJIHACHI K *et al*, 2005; LEFRANÇOIS L *et al*, 2005). A secreção de IgA é um dos principais objetivos da resposta imune da mucosa (BRANDTZAEG P *et al*, 2010). Essa imunoglobulina tem a função de proteger os indivíduos dos antígenos que penetram por essa via (MESTECKY J *et al*, 2009) por dois mecanismos principais: a exclusão, que gera a incapacidade de adesão do antígeno ou do patógeno ao epitélio pela reação antígeno-anticorpo, e a secreção, em que os antígenos que ultrapassam o epitélio são capturados pelas IGA e conduzidos para o lúmen via receptores de Ig (BRANDTZAEG P *et al*, 2007).

A imunização pela via intranasal também altera a expressão de moléculas na superfície das células, importantes para a locomoção das mesmas pelo organismo. Após essa imunização ocorre o aumento da expressão do CCR9 e da integrina  $\alpha 4\beta 7$  em linfócitos T e B (moléculas que promovem o *homing* dos linfócitos em tecidos linfoides) (DAVID J, 2000). As células dendríticas encontradas em tecidos associados à mucosa nasal possuem um importante papel na indução de uma resposta imune sistêmica, pois podem captar antígenos presentes na mucosa para órgãos linfoides não associados a este tecido, como o baço e linfonodos periféricos (MACPHERSON G *et al*, 1999).

O grande conhecimento sobre a genética e fisiologia da *L. chagasi* e a existência de vetores capazes de promover a expressão de proteínas possibilitou sua utilização em diferentes abordagens vacinais. Um dos primeiros estudos utilizando a via mucosa na imunização contra leishmaniose foi feito por Xu e colaboradores em 1995, onde a mucosa escolhida foi a oral, por onde foi administrada *Salmonella*

*thypimurium* atenuada. Nesse estudo, plasmídeos com genes para gp63, IFN- $\gamma$  e TNF, utilizados na imunização, protegeram os animais da infecção por *L. Major*, o que foi demonstrado pela diminuição da lesão. Outro estudo promissor demonstrou que a administração do antígeno bruto de *L. amazonensis* em mucosa nasal e em oral promoveu uma resposta protetora contra a leishmaniose cutânea murina, como demonstrado pelo aumento da produção do IFN- $\gamma$  e diminuição de IL-10 nos linfonodos drenantes e distais da lesão. Essa resposta protetora também foi observada na administração nasal de DNA expressando a proteína p36 LACK (PINTO EF *et al*, 2003; PINTO EF *et al*, 2004). Devido à sua resposta promissora contra leishmaniose cutânea murina, a vacinação com plasmídeo pCI-neo codificando o gene LACK da *Leishmania* administrado por via nasal também foi testada contra a leishmaniose visceral murina, se mostrando eficaz por diminuir a carga parasitária, a produção de IL-10 e também por aumentar a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 durante a infecção (GOMES DCO *et al*, 2007).

É importante ressaltar que, além de tudo que já foi demonstrado quanto à eficácia das vacinas mucosas, elas possuem outras vantagens quando comparadas com as vacinas parenterais. São elas: impedimento do risco potencial com agulhas contaminadas, diminuição de tempo e custos envolvidos na administração da vacina parenteral por profissionais de saúde e melhoria da aceitação da vacinação pela população em geral (AMORIJ JP *et al*, 2010). Vacinas mucosas também não precisam de purificação extensiva de subprodutos bacterianos, enquanto que a mesma formulação de vacina injetada por via parenteral, por exemplo, teria níveis inaceitáveis de endotoxina (YUKI Y *et al*, 2009).

## 1.7. Adjuvantes

Os adjuvantes vacinais são substâncias que proporcionam um aumento da imunogenicidade quando administrados conjuntamente a antígenos, já que muitos destes são pouco imunogênicos (LECLERC C, 2003). Eles também proporcionam o direcionamento da resposta imune, com o favorecimento de determinada função imune importante no controle do parasito em questão (SINGH M *et al*, 2003).

Dentre os adjuvantes capazes de induzir resposta imune Th1 utilizados em associação com antígenos de *Leishmania*, destacam-se a saponina, os oligodeoxinucleotídeos e a IL-12.

A saponina foi testada em associação ao antígeno ligante de fucose manose (FML) de *L. donovani* em camundongos Swiss contra a leishmaniose visceral. Foi observado que essa associação gerou uma significativa resposta protetora específica, onde os animais apresentaram redução da carga parasitária no fígado, aumento da produção de IL-12 e de anticorpos específicos contra o parasito (SANTOS WR *et al*, 2002). A saponina também foi testada em associação com outro antígeno, a gp36, uma glicoproteína extraída da *L. donovani*. Neste trabalho também foi observada redução da carga parasitária no fígado devida ao aumento da produção de anticorpos IgG e de IFN- $\gamma$  (PARAGUAI SE *et al*, 2001).

Os oligodeoxinucleotídeos correspondem a sequências de dinucleotídeos (citosina, C e guanidina, G) não metilados de bactérias, denominadas CpG-ODN. Sequências de CpG-ODN induzem a proliferação de células B e a produção de imunoglobulina G, secreção de citocinas por monócitos, aumento da atividade citotóxica de células *natural killer* (NK) e liberação de IFN- $\gamma$  (KRIEG AM *et al*, 2000). A resposta contra CpG-ODN parece ser mediada pela ligação deste com receptores de reconhecimento padrão, nesse caso TLR9 (HEMMI H *et al*, 2000). A CpG-ODN já foi testada em associação a antígeno solúvel de *L. major* em BALB/c contra a leishmaniose cutânea, onde apresentou redução da lesão quando comparado com os animais que receberam apenas o antígeno solúvel (WALKER OS *et al*, 1998). Outro estudo demonstrou que a associação de CpG-ODN com uma proteína recombinante de *L. donovani*, administrados a camundongos BALB/c, protege os animais contra a leishmaniose visceral. O resultado foi a indução de uma resposta imune celular específica Th1, com aumento de proliferação celular, da produção de

IL-12 e IFN- $\gamma$ , além de redução parcial de carga parasitária no baço e fígado (TEWARY P *et al*, 2005).

A IL-12 é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos e neutrófilos, e estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células *natural killer*, promove diferenciação de linfócitos T CD4+ em células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , além de aumentar a atividade citolítica de células NK ativadas e de linfócitos T CD8+ (KOBAYASHI M *et al*, 1989). Por essa capacidade na indução da resposta imune do tipo Th1, a IL-12 já foi testada como adjuvante em diferentes formulações vacinais (HEINZEL FP *et al*, 1993; AFONSO LC *et al*, 1994; YAMAKAMI K *et al*, 2001; SALDARRIAGA OA *et al*, 2006; TEWARY P *et al*, 2006).

Em 1994, a IL-12 foi testada como adjuvante associado a extrato de antígenos solúveis de *L. major* para avaliar a resposta imune gerada em camundongos BALB/c. Nesse estudo, foi observado que estes animais produziram maior quantidade de IFN- $\gamma$  e menor de IL-4 em células do linfonodo drenante quando comparados aos controles negativos que apresentaram uma resposta do tipo Th2 (AFONSO LC *et al*, 1994). Alguns anos depois, foi administrado a camundongos BALB/c extrato de antígenos solúveis de *L. major* associado ao plasmídeo codificador de IL-12 murina antes de desafiá-los com o parasito vivo. A resposta apresentada por estes animais foi do tipo Th1 com aumento da produção de IFN- $\gamma$  e anticorpos IgG2a quando comparados aos controles (YAMAKAMI K *et al*, 2001). Esse plasmídeo foi testado também em associação a um antígeno recombinante de *L. donovani* (rORFF) na proteção de camundongos BALB/c contra a leishmaniose visceral, observou-se um 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 P *et al*, 2006).

### **1.8. Adjuvante CAF01**

O dimetil dioctadecil amônio (DDA) é um composto quaternário de amônio, e é formado por um lípido anfifílico sintético compreendendo um grupo hidrofílico dimetilamônio carregado positivamente (cabeça) ligado a duas cadeias hidrofóbicas de alquilo de 18 carbonos (cauda). O DDA já se mostrou efetivo como adjuvante por promover resposta imune humoral e mediada por célula (DAVIDSEN J *et al*, 2005). Apesar desta efetividade, foi observado que os lipossomas de DDA são fisicamente

instáveis na presença de pequenas quantidades de sais e em água pura, que aumentam sua agregação ao longo do tempo (HILGERS LAT *et al*, 1991).

O trealose 6,6'-dibeenato (TDB), um glicolípido 6,6'-di-éster de  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -trealose com duas cadeias longas de carbono-22 acilo (ácido beénico), foi utilizado para resolver o problema da estabilidade do DDA, sendo incorporado às camadas duplas de lipossoma do DDA. Assim, esse novo adjuvante DDA-TDB, também conhecido como CAF01, se mostrou um composto estável e capaz de estimular a resposta imune Th1 mediada por células e a produção de anticorpos, se tornando, então, um adjuvante vantajoso para um alto número de doenças, incluindo doenças infecciosas e cânceres (DAVIDSEN J *et al*, 2005).

Em 2008, Agger e colaboradores testaram a imunogenicidade e a eficácia do CAF01 em três modelos de doenças experimentais, cada uma com diferente exigência imunológica: *Mycobacterium tuberculosis* (resposta imune mediada por célula), *Chlamydia trachomatis* (resposta imune mediada por célula e resposta humoral) e malária no estágio sanguíneo (resposta humoral). Diferentes grupos de camundongos foram vacinados por via subcutânea, cada qual para determinada doença e, para comparar, foram utilizados outros tipos de adjuvantes. O resultado observado foi que, quando comparado a diferentes adjuvantes disponíveis comercialmente, o CAF01 foi especialmente eficaz na geração de uma forte resposta imune celular além de também apresentar uma acentuada resposta humoral, com altos títulos de IgG2, apresentando, assim, níveis significantes de proteção contra estas doenças quando associado aos respectivos antígenos vacinais (AGGER EM *et al*, 2008).

Recentemente, o CAF01 foi utilizado como adjuvante para vacina mucosa, quando foi avaliado também o seu efeito sobre a viabilidade das células epiteliais da mucosa. Neste estudo, o adjuvante foi testado *in vitro* utilizando como modelo a cultura de células Calu-3, uma linhagem de células do epitélio brônquico humano, a fim de elucidar a deposição epitelial, absorção e retenção do antígeno após administração do sistema lipossomal. Já o efeito de CAF01 sobre a viabilidade das células foi investigado por análise da integridade do epitélio das células da camada e a atividade metabólica das células Calu-3, pois havia uma preocupação de existir algum risco de dano às células epiteliais na imunização pelas vias aéreas. O estudo demonstrou que o CAF01 tem o poder de aumentar a permeabilidade através do muco e da camada epitelial, indicando que ele melhora o transporte do antígeno

através da camada mucosa. Além disso, esse adjuvante não apresentou características de diminuir nem a integridade nem a viabilidade das células Calu-3, sugerindo que o CAF01 é um adjuvante bem tolerado pelo epitélio das vias aéreas. Neste mesmo estudo foi feita uma avaliação em um modelo vivo, onde camundongos BALB/c foram vacinados por via intranasal com uma mistura da Vaxigrip (Sanofi Pasteur MSD) 1µg/dose, uma vacina contra influenza disponível comercialmente, e do adjuvante CAF01 150 µg/dose. Após a imunização dos animais, foi determinada a produção de IFN-γ específico para a vacina pelos esplenócitos e do nível sérico de IgG. Foi observado que a produção de IFN-γ antígeno específica pelas células do baço de animais imunizados com a vacina associada ao adjuvante foi 4 vezes maior do que os animais que receberam apenas a vacina, e o nível de IgG específica à vacina também foi maior no soro de animais que receberam a vacina com o adjuvante. Assim, concluíram que a adição do CAF01 à vacina aumentou significativamente a resposta imune específica a mesma (CHRISTENSEN D *et al*, 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz para combater a LV é necessário. O antígeno total bruto de *L. amazonensis* (LaAg) administrado por via mucosa conferiu proteção contra a leishmaniose cutânea em camundongos como já demonstrado por nosso grupo (PINTO EF *et al*, 2003). Neste trabalho, testamos a administração intranasal do LaAg associando a ele um novo adjuvante, o CAF, com o intuito de induzir aumento e direcionamento da resposta imune na proteção de camundongos BALB/c contra a LV.

## **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos imunogênicos e protetores da administração intranasal de antígenos totais de *Leishmania amazonensis* (LaAg) na forma livre ou associado ao adjuvante CAF (dimetil dioctadecil amônio (DDA) + trealose 6,6'-dibeenato (TDB)) frente à infecção por *L. Chagasi* de camundongos BALB/c.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a biocompatibilidade da vacina pela dosagem de transaminases (ALS ALT) e creatinina séricas;
- Realizar a imunofenotipagem de células da memória imunológica e produtoras de citocinas após a vacinação e desafio;
- Avaliar as respostas linfoproliferativas após vacinação e após desafio;
- Avaliar a produção *in vitro* de óxido nítrico após vacinação e após desafio;
- Avaliar a produção *in vitro* das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 após vacinação e após desafio;
- Avaliar a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a após vacinação;
- Avaliar o efeito protetor da vacina pela quantificação da carga parasitária em baço e fígado de animais infectados com *L. chagasi*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Preparação do antígeno total bruto de *L. amazonensis*

Foram utilizadas promastigotas totais de *Leishmania amazonenses* (cepa referência PH8), cedidas pelo Banco de Cepas de *Leishmania* do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Biofísica da UFRJ. Estes parasitos foram cultivados em estufa a 24°C até o final da fase logarítmica de crescimento em meio Grace (Sigma, USA) pH 6,8, suplementado com Hemina (Sigma, USA) 0,2%, antibiótico (penicilina/estreptomicina) 0,5% e 5% de urina humana previamente centrifugada a 1500 rpm/24°C/10 min e esterilizada em membrana 0,22 µm. Após o crescimento, os parasitos eram centrifugados a 3000 rpm/5°C/10min e lavados três vezes em solução salina tamponada esterilizada (PBS). O precipitado foi submetido a dez ciclos de aquecimento em banho-maria a 37°C e congelamento em nitrogênio líquido a -196°C (Coelho *et al.*, 2003). Após a lise, 200 µL do antígeno foram aliquotados para realizar a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry e cols., 1951) e o restante armazenado em alíquotas a -70°C para posterior utilização.

### 4.2. Cinética de crescimento de *L. chagasi*

Uma cultura de *Leishmania chagasi* cepa referência PP75 cedida pelo Banco de Cepas de *Leishmania* do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infeciosas da UFES, com concentração inicial de 10<sup>6</sup> parasitos/mL, foi mantida em Grace suplementado, pH 6,8 durante 1 semana. Diariamente, uma alíquota de 10 µL foi retirada para realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer pelo período de 7 dias.

### 4.3. Animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos fêmeas e machos da linhagem BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal Fluminense e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo em estufas sob

condições apropriadas de temperatura, umidade e luz. Os camundongos foram mantidos em gaiolas convencionais com maravalha previamente esterilizada, recebendo água filtrada e ração comercial (Purina®) *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal CEUA-UFES número 014/2011.

#### **4.4. Parasitos para infecção**

Foram utilizados promastigotas totais de *Leishmania chagasi* (cepa referência PP75) cultivados em Grace suplementado, pH 6,8 por quatro dias. A cultura foi centrifugada a 3000 rpm/5°C/10 min e lavada duas vezes com PBS. O sedimento foi ressuspensionado em PBS para realização da contagem dos parasitos e posterior ajuste para uma concentração final de  $10^7$  *Leishmania*/animal injetados em veia caudal.

#### **4.5. Cinética da infecção de camundongos BALB/c por *L. chagasi***

Os camundongos foram infectados e, a cada semana, parte foi eutanasiada para que fossem quantificados os parasitos no baço e fígado. A carga parasitária de cada órgão foi determinada pelo método de diluição limitante (BUFFET *et al*, 1995). Brevemente, tubos previamente pesados eram acrescidos com os órgãos para que se pudesse determinar a massa dos mesmos. Os órgãos foram macerados separadamente sobre uma peneira em placa de petri com o auxílio de um êmbolo de seringa e o macerado do órgão transferido para um tubo cônico com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Foi transferida uma alíquota em duplicata de 200 µL dessa suspensão de células para o primeiro poço de uma placa de fundo cônico de 96 poços (BRANDplates®). O restante dos poços foi preenchido com 100 µL de Grace e foi feita uma diluição seriada 1:2 para os poços subsequentes conforme a figura.

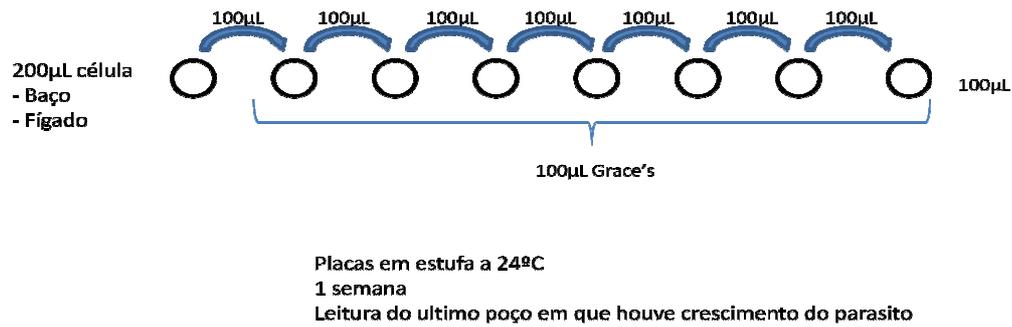


Figura 1: Diluição seriada 1:2 para análise da carga parasitária.

A placa foi incubada por 7 dias em estufa a 24°C. Ao fim do tempo a placa foi levada ao microscópio óptico para avaliar qual o último poço da diluição apresentava crescimento de *Leishmania*. O número de parasitos foi determinado pela maior diluição seriada na qual parasitas móveis podiam ser visualizados sendo então calculado o número dos mesmos por órgão.

#### 4.6. Imunização intranasal

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais e imunizados por instilação nasal com auxílio de uma pipeta. A imunização foi realizada em duas doses com um intervalo de 2 semanas entre elas. Os animais utilizados para os experimentos de imunogenicidade foram sacrificados 1 dia após a 2ª dose. Os animais utilizados na avaliação da imunidade protetora foram infectados sete dias após o reforço e sacrificados 2 semanas após a infecção. O tempo de 2 semanas corresponde ao pico de carga parasitária no fígado e baço nas condições de infecção utilizadas, conforme avaliação prévia.

Tabela 1: Grupos de camundongos e doses das imunizações:

Grupos	Doses
G1	20µL PBS
G2	25µg LaAg em 20µL de PBS
G3	25µg LaAg + 150µg CAF em 20µL
G4	150µg CAF em 20µL

#### **4.7. Dosagem de transaminases (ALT e AST) e Creatinina**

A dosagem de transaminases e creatinina foi determinada por ensaio colorimétrico com o kit comercial Doles<sup>®</sup>, utilizando 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 µg/mL) e Creatinina (0,05 µg/mL). Em seguida, foi acrescentado 1 mL do reagente de cor em cada tubo (amostras e curva padrão) e feita a homogeneização, deixando-os em repouso em temperatura ambiente por 20 min. Acrescentou-se, a cada tubo, 10 mL de Hidróxido de Sódio 0,4 M e homogeneizou-se novamente, permanecendo em repouso por 2 min até a realização da leitura em espectrofotômetro a 505 nm (Varioskan Flash – Thermo<sup>®</sup>).

#### **4.8. Obtenção de leucócitos de baço e linfonodos**

Os camundongos eutanasiados tiveram o baço e os linfonodos cervicais removidos. Os órgãos foram macerados em DMEM (Gibco<sup>®</sup>) pH 7,2, suplementado com bicarbonato de sódio 3,7 mg/mL, HEPES 4,7 mg/mL (Sigma<sup>®</sup>) e Soro Fetal Bovino 10%. O macerado foi transferido para um tubo cônico de 15 mL com o auxílio de uma pipeta Pasteur para posterior centrifugação a 1500 rpm/4°C/10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células dos linfonodos foram ressuspensas em 5 mL de DMEM suplementado. Uma parte da suspensão foi separada para o experimento de imunofenotipagem *ex-vivo*, e outra parte recebeu 3 mL de solução de lise de hemácias (TRIS Base 2,06 mg/mL mais cloreto de amônio 7,7 mg/mL em água deionizada) pH 7,2 por 3 min. No final deste tempo foram acrescentados ao tubo 10 mL de PBS e a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm/4°C/10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de DMEM suplementado. As células foram coradas com solução de azul de tripan para a contagem, em microscópio, em câmara de Neubauer. Após os cálculos, as células tiveram sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$ /mL e foram plaqueadas no volume de 1 mL em placas de 24 poços (BRANDplates<sup>®</sup>) contendo ou não o estímulo LaAg (50 µg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas por 4 dias em estufa a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> e os sobrenadantes e as células foram utilizados para a realização dos estudos de imunogenicidade e imunidade protetora.

#### 4.9. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Para análise da presença de células de memória, 200  $\mu$ L de células do baço e dos linfonodos de cada animal foram transferidos para um tubo de citometria, centrifugadas a 1440 rpm/7min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas e incubadas em 50  $\mu$ L de solução de DMEM com anticorpos monoclonais CD4, CD8, CD44 e CD62L (eBioscience<sup>®</sup>) acoplados a diferentes fluorocromos, FITC, PE, APC e PeCy-5 respectivamente, na proporção de 1:200 e mantidas a 4°C por 30min. Após o tempo, as células foram centrifugadas 1440rpm /7min, lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução de fixação (PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1%). Após 30 minutos foram adquiridas 100.000 células pelo citômetro de fluxo (BD<sup>®</sup> FACSCalibur system) utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Para análise da produção de citocinas intracelulares, as células foram previamente marcadas com anticorpos monoclonais extracelulares CD4 e CD8 (eBioscience<sup>®</sup>) como descrito previamente. Após a marcação extracelular as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100  $\mu$ L de solução de fixação por 15 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 500  $\mu$ L de solução de permeabilização (BD<sup>®</sup>) e a suspensão foi centrifugada a 1440 rpm/7min. As células foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de DMEM com anticorpos monoclonais anti-IL10 e anti-IFN- $\gamma$  (eBioscience<sup>®</sup>) acoplados aos fluorocromos APC e PE respectivamente, na proporção de 1:200 por 30 minutos a 4°C. Depois disso, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução de fixação para aquisição no citômetro.

A figura 2 ilustra e exemplifica o processo de análise da presença de células de memória nas amostras estudadas. Primeiramente foi determinada a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, identificados pelo tamanho celular e expressão desse marcador em FL1 (Figura A). Em seguida, foram identificados os eventos de células T CD4<sup>+</sup> de memória, com base na expressão dos marcadores CD44 e CD62L, cujas fluorescências foram captadas em FL3 e FL4 (Figura B). o mesmo procedimento deve ser extrapolado para as células T CD8<sup>+</sup>.

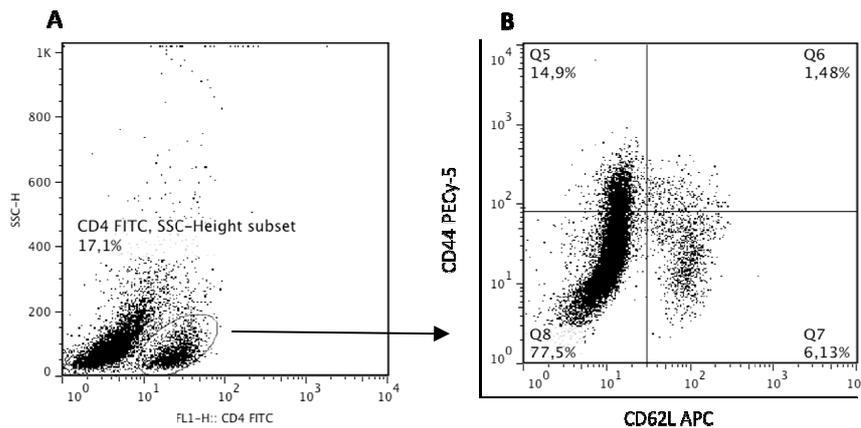


Figura 2: Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5. Seleção de células CD4<sup>+</sup>, por meio dos parâmetros tamanho versus fluorescência relativa detectada por FL1 (A) Quantificação dos eventos de células TCD4<sup>+</sup> de memória mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL3 versus FL4 (B).

#### 4.10. Dosagem de NO

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada pelo método de Griess descrito por Green e colaboradores (1982). Resumidamente, foi utilizada uma curva padrão com N<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, iniciada na concentração de 50 µM. O reagente de Griess foi preparado utilizando uma solução a 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Sulfanilamida (Sigma-Aldrich®) na concentração de 1% e α-Naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) (Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,1%. A reação foi realizada adicionando-se 50 µL das amostras do sobrenadante das culturas em duplicata em placas de 96 poços. Em seguida foram misturadas na proporção 1:1 NEED e Sulfanilamida (reagente de Griess) e adicionados 50 µL em todos os poços. Para o branco foi utilizado, 0,5 mL de DMEM completo e 0,5 mL de solução de Griess. A reação foi lida após 10 minutos no leitor de placas a 540 nm (SpectraMax, Molecular Devices).

#### 4.11. Proliferação

Parte dos esplenócitos ajustados na concentração de 5x10<sup>6</sup>/mL, conforme descrito no item 4.8, foi separada para análise da proliferação de leucócitos totais dos animais vacinados e controles. Para isso, as células foram marcadas com *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) (Invitrogen®), como descrito a seguir. A suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm/10 min e ressuspendida em 2 mL de PBS, foram acrescentados a esta suspensão 2 µL de CFSE por 2 minutos e, então, adicionados 5 mL de uma solução contendo SFB e

PBS na proporção 1:1. As células foram centrifugadas a 1500rpm/10 min e ressuspensas em DMEM + SFB 10% para serem então plaqueadas em triplicata, estimuladas ou não com 50 µg/mL de LaAg por 4 dias. No quarto dia as células foram transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 1440 rpm/7 min e ressuspensas em 200 µL de solução de fixação por 20 min ao abrigo da luz a 4°C para então serem adquiridas no citômetro de fluxo (BD<sup>®</sup> FACSCalibur system). Foram adquiridos 50.000 eventos, utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise foi realizada pelo software FlowJo (versão 7.6.5, TreeStar, Ashland, OR, USA).

#### **4.12. Dosagem de citocinas**

As dosagens de IFN-γ, IL-4, IL-10 foram realizadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilados da eBioscience<sup>®</sup>, seguindo a recomendação do fabricante. Em síntese, placas de 96 poços de alta absorção (Costar<sup>®</sup>) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 (0,05%) e as amostras de sobrenadante de cultura 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, seguido de adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience<sup>®</sup>) por 30 min/25°C. As amostras foram reveladas com 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>) 30 vol e a reação interrompida com dodecil sulfato de sódio (Gibco<sup>®</sup>) 1%. A absorbância foi determinada sob comprimento de onda de 405 nm. (SpectraMax, Molecular Devices).

#### **4.13. Dosagem de classes e subclasses de imunoglobulinas**

As dosagens de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2a) foram realizadas pela técnica de ELISA após a sensibilização de placas de 96 poços com extrato total de *L. chagasi* (50 µg/mL) por 18 h/25°C. Posteriormente, os soros testes foram incubados na diluição de 1:100, seguido de tratamento com anticorpos secundários, conjugados com a Proteína A/peroxidase (KPL-USA), na diluição de 1:16000. Para a revelação

foi utilizado o tampão OPD (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,83M, Ácido Cítrico 0,33M, O-fenil-diamina 0,05M) e peróxido de hidrogênio a 7,5%, seguido de leitura a 492nm.

#### **4.14. Determinação da carga parasitária**

200 µL da suspensão de células do baço e do fígado dos animais foram transferidos para o primeiro poço de uma placa de fundo cônico de 96 poços (BRANDplates®), o restante da coluna foi preenchido com 100 µL de Grace e feita uma diluição seriada 1:2 por 12 poços subseqüentes.

As placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 24°C. Ao final, foi calculado o número de *Leishmania* por órgão, tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento do parasito.

#### **4.15. 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).

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cinética de crescimento

A cepa PP75 de *L. chagasi* utilizada na realização deste trabalho foi gentilmente cedida pela professora Elenice, do laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES. Visto que não conhecíamos o comportamento de crescimento e características da cepa, inicialmente nos propusemos a avaliá-las repicando uma alíquota da cultura em meio Grace. Na figura 3 podemos observar a variação da concentração de *Leishmania* ao longo dos dias de cultura, sendo que no quarto dia ocorreu o final da fase logarítmica, com crescimento máximo dos parasitos e, após esse tempo, há o declínio progressivo da curva.

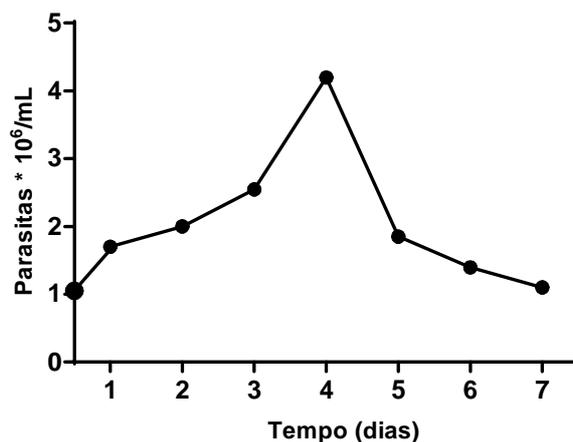


Figura 3: Cinética de crescimento de *L. chagasi* PP75 em meio de cultura Grace's suplementado, pH 6,8. A cultura foi iniciada com uma concentração de  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL e mantida em estufa a 24°C durante 7 dias. Diariamente foi retirada uma alíquota para contagem das Leishmanias e determinação da concentração cultura.

### 5.2. Cinética da infecção

Uma vez determinada a cinética de crescimento e comportamento dos parasitos em cultura, nos propusemos a determinar o pico do parasitismo *in vivo*, para que pudéssemos realizar os experimentos de vacinação e desafio. Assim, camundongos BALB/c foram infectados com  $10^7$  formas totais de *L. chagasi* e eutanasiados semanalmente. Conforme observado na figura 4 A e B, para ambos os órgãos (baço e fígado), o pico de parasitismo ocorre por volta da segunda semana de infecção, declinando com o passar das semanas de avaliação. Além disso, uma maior carga parasitária foi observada no Fígado, quando comparado às mesmas semanas de avaliação do baço.

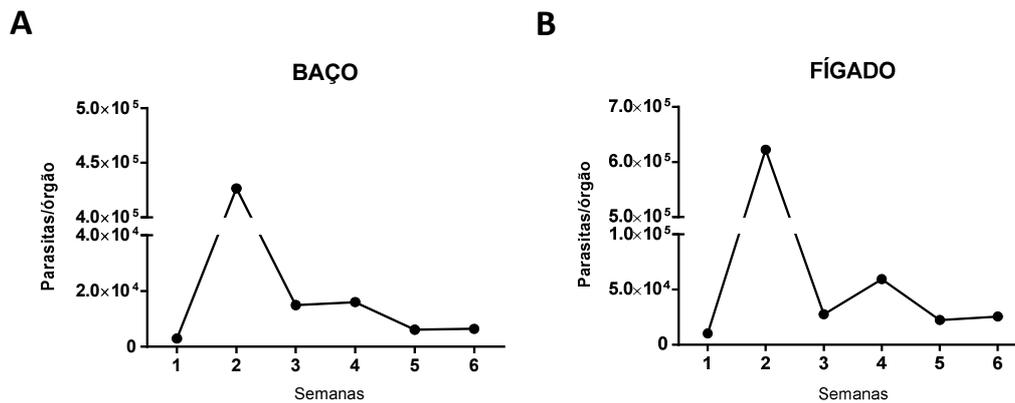


Figura 4: Cinética de Infecção. Camundongos BALB/c infectados em veia caudal com 107 *L. chagasi* foram sacrificados semanalmente para que se pudesse determinar a cinética de infecção e o pico parasitário no baço (A) e fígado (B).

### 5.3. Biocompatibilidade da vacina LaAg livre ou associada ao CAF *in vivo*

Antes de iniciarmos os experimentos de imunização e desafio, nos propusemos a avaliar a biocompatibilidade da vacina *in vivo*. Para isso, camundongos foram vacinados, conforme descrito anteriormente e eutanasiados 24 horas após o reforço. O soro foi coletado e as concentrações de transaminases (ALT e AST) e creatinina foram determinadas. Utilizamos como controle positivo animais que receberam tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) por via intraperitoneal. Os controles negativos receberam apenas PBS.

Conforme podemos observar na figura 5, não foram detectadas diferenças significantes entre nenhum dos grupos imunizados. De forma esperada, observamos grandes quantidades de transaminases e creatinina apenas no controle positivo injetado com o CCl<sub>4</sub>, quando comparados aos demais grupos.

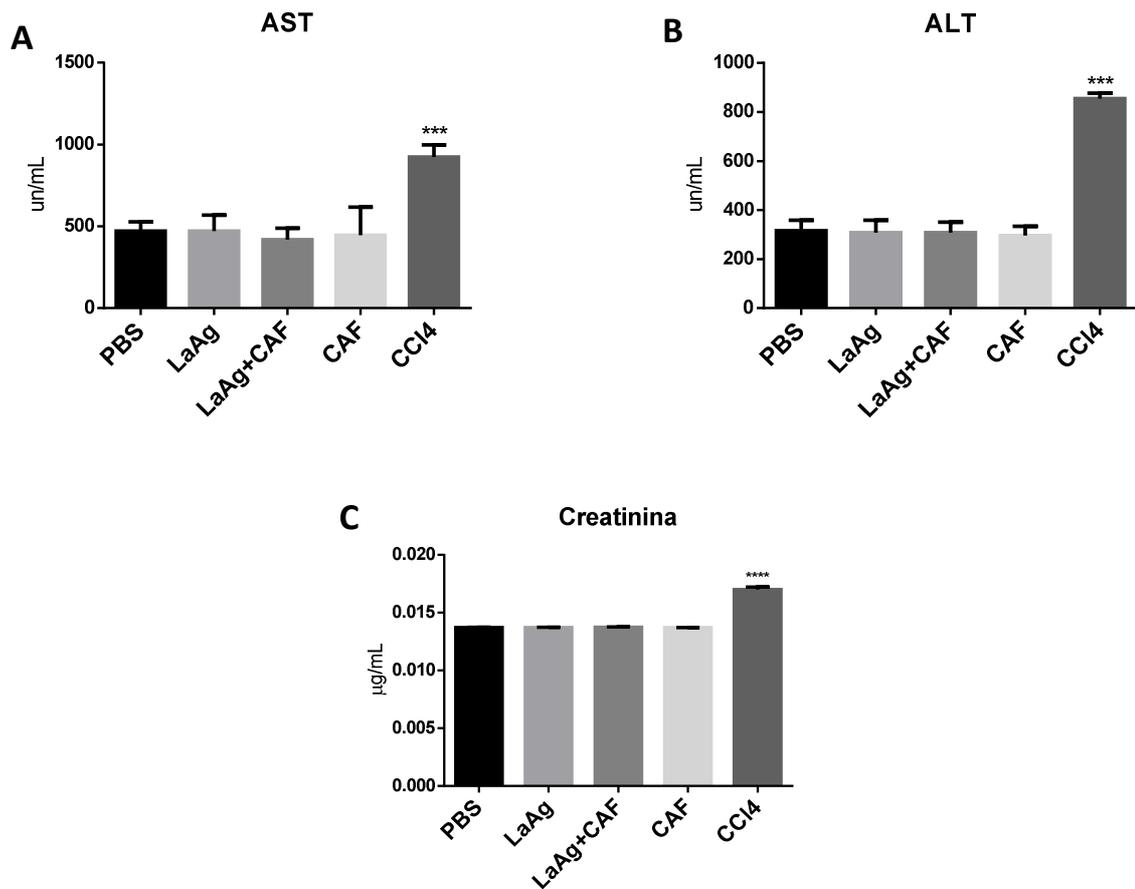


Figura 5: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante CAF. Dosagem de transaminases AST (A), ALT (B) e creatinina (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\* p < 0,0001 em relação ao controle positivo CCl4.

#### 5.4. Imunogenicidade da vacina LaAg livre ou associada ao adjuvante CAF

A primeira avaliação feita com relação à imunogenicidade gerada pelas diferentes imunizações foi a análise *ex vivo* da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais e de memória em linfonodos cervicais.

Os resultados indicaram um perfil semelhante e sem diferença significativa entre linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais e entre as células de memória, dos grupos de animais imunizados ou controles (Figura 6).

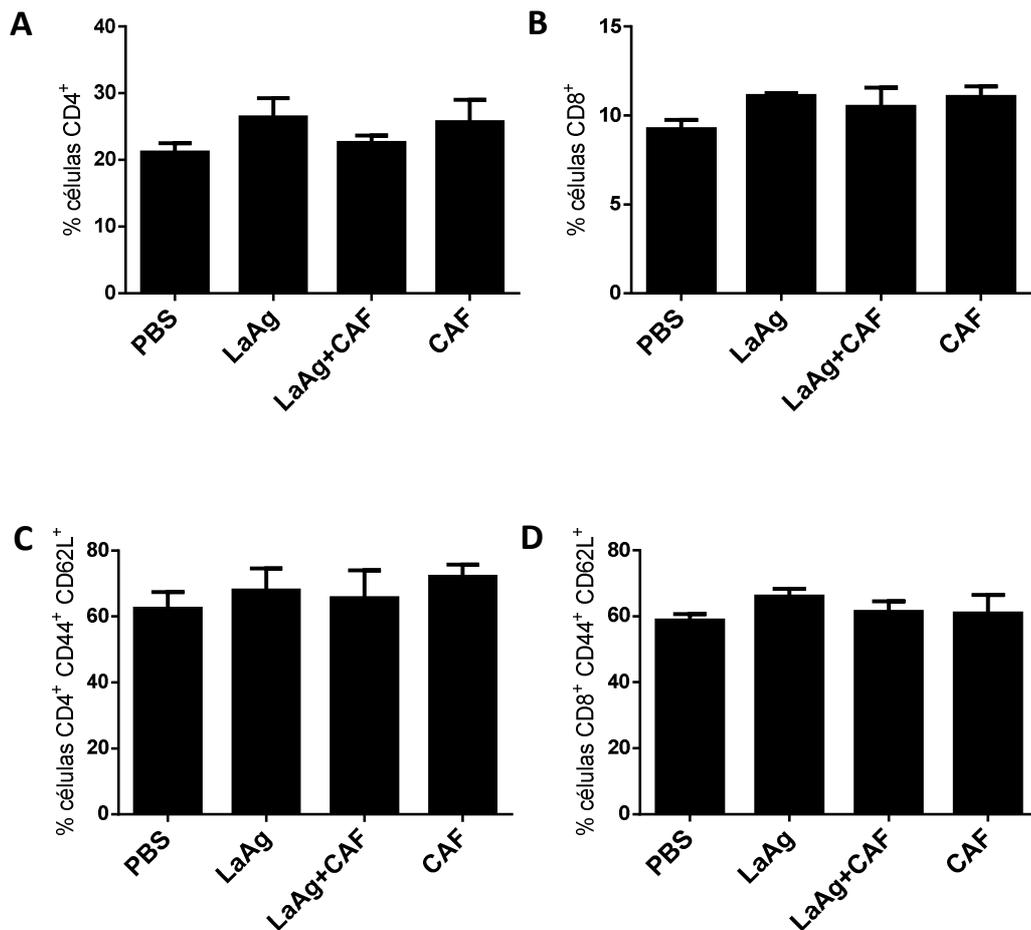


Figura 6: Análise *ex vivo* das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> (B) totais e de memória TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (C) e TCD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (D) em linfonodos cervicais, 24 horas após a segunda dose das formulações vacinais. O resultado representa a média de três experimentos.

Uma vez analisada essas populações de linfócitos, nos propusemos a avaliar os efeitos da vacinação sobre a capacidade linfoproliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos do parasito. Conforme a figura 7, podemos notar que os animais vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF, bem como o adjuvante sozinho apresentam índices de proliferação significativamente maiores quando comparados ao grupo controle PBS. Além disso, significantes respostas linfoproliferativas foram observadas em resposta ao antígeno, quando comparado aos controles não estimulados.

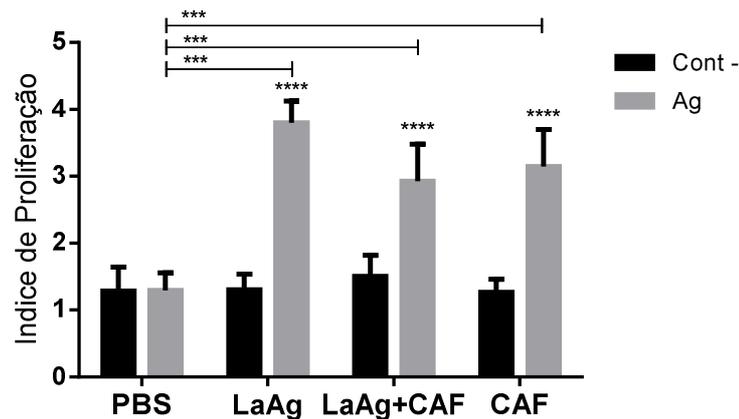


Figura 7: Efeito da vacinação intranasal na resposta linfoproliferativa. Esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF bem como o adjuvante sozinho, foram coletados 24 horas após o reforço, marcados com CFSE e reestimulados *in vitro* com 50 µg/mL de LaAg por 96 horas. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa em índice de proliferação celular (IP). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação aos controles.

Posteriormente à proliferação celular, passamos para a avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA sanduíche e de NO nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos de animais vacinados reestimulados *in vitro* com LaAg.

A imunização intranasal promoveu aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos dos animais vacinados com LaAg livre ou em associação ao CAF em comparação às células não estimuladas (Figura 8A).

De forma semelhante, observamos respostas significantes da produção de NO por esplenócitos de animais vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF e só com o adjuvante, em resposta ao estímulo com antígeno específico quando comparado aos grupos controles (Figura 8B). Adicionalmente, não verificamos diferenças significativas nas produções de IL-10 e IL-4 pelas células dos animais vacinados ou controles, em resposta ao reestímulo com antígeno (dados não mostrados).

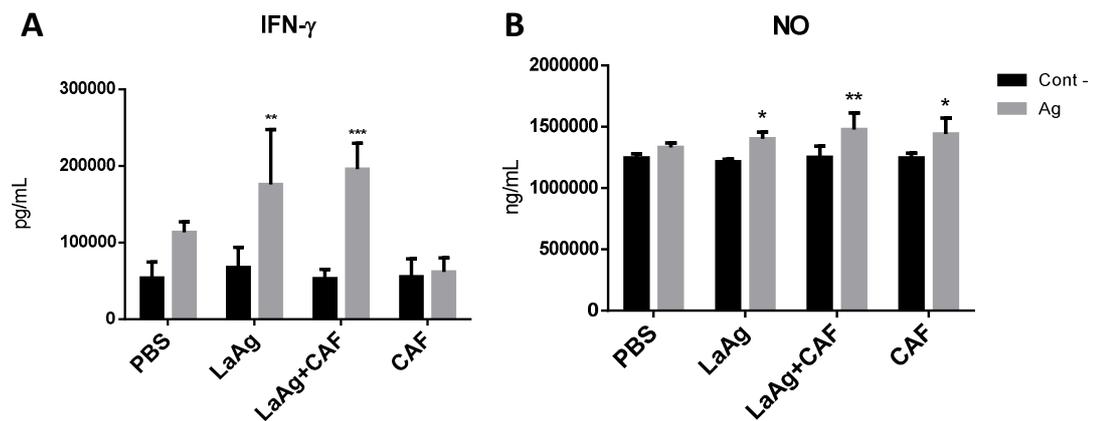


Figura 8: Efeito da vacinação intranasal sobre a produção de IFN- $\gamma$  e NO. Produção de IFN- $\gamma$  (A) e NO (B) em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com LaAg livre ou associado ao CAF e com adjuvante sozinho em 2 doses intervaladas por 14 dias. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o reforço para retirada de esplenócitos que foram posteriormente reestimulados *in vitro* com 50 $\mu$ g/mL de LaAg. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche e a de NO pelo método de Griess 96hs após a reestimulação. O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles não estimulados.

Além das dosagens de citocinas e NO, nos propusemos a avaliar se os distintos protocolos vacinais poderiam estar correlacionados com a estimulação diferencial das populações de células T.

Como podemos constatar na figura 9A, a estimulação com antígenos induziu aumentos significantes de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quando comparados ao controle não estimulado. Além disso, animais vacinados com LaAg apresentaram aumento significativo da percentagem total de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quando comparadas ao grupo controle PBS. Quando avaliamos a população de linfócitos TCD8<sup>+</sup> totais, observamos um aumento significativo da população apenas nos grupos imunizados com CAF sozinho ou associado ao LaAg (Figura 9B). Já com relação à população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> de memória (linfócitos TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>), observamos que a reestimulação *in vitro* promoveu um aumento significativo com relação aos controles não estimulados. Também foi observado um aumento significativo da percentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> de memória nos grupos imunizados com LaAg livre e associado ao CAF quando comparados ao grupo controle PBS (Figura 9C). A análise de linfócitos TCD8<sup>+</sup> de memória (linfócitos TCD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) não demonstrou diferença significativa entre nenhum dos grupos imunizados (dados não mostrados).

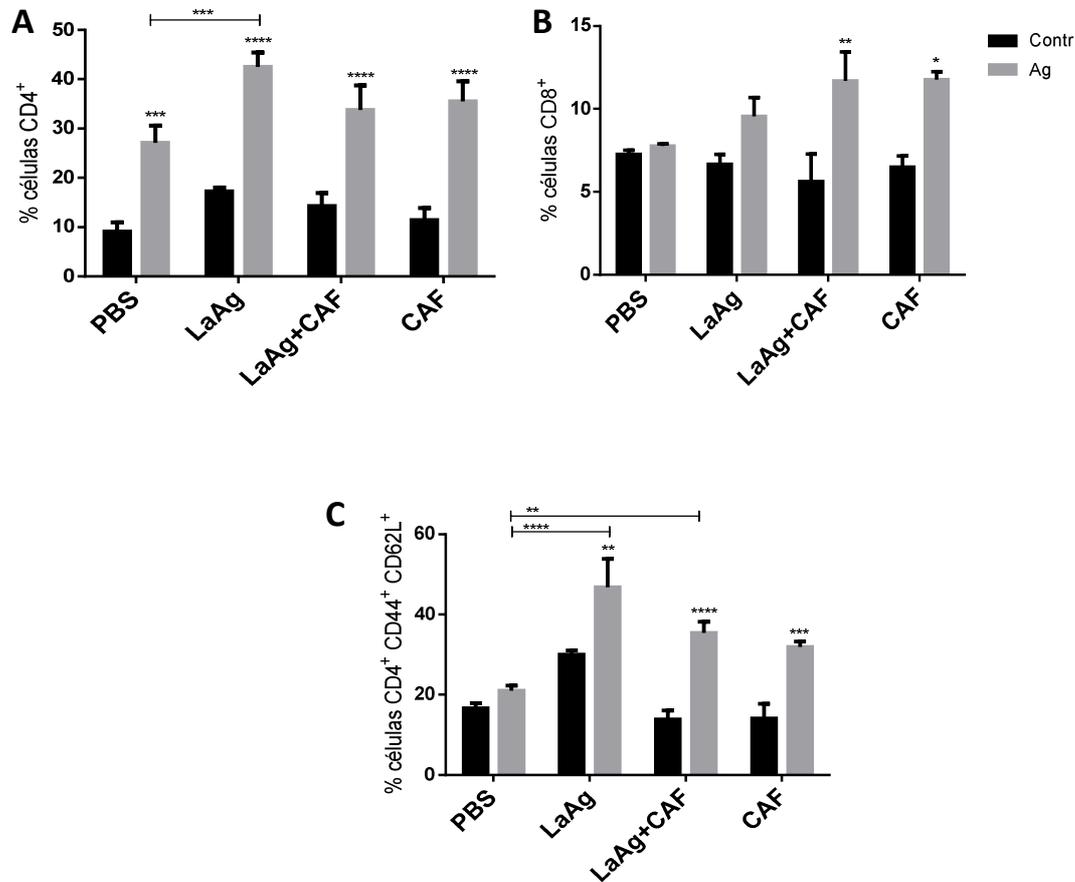


Figura 9: Análise das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> (B) totais e de memória TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (C) em esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF bem como o adjuvante sozinho, coletados 24 horas após o booster e reestimulados *in vitro* com 50 µg/mL de LaAg por 96 horas. O resultado representa a média de três experimentos. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 em relação aos controles.

Além de dosarmos a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas, também avaliamos a porcentagem dos linfócitos produtores das citocinas IL-10 e IFN-γ. Nesta análise, observamos que o estímulo com o antígeno promoveu um aumento significativo tanto de células TCD4<sup>+</sup> quanto de TCD8<sup>+</sup> produtoras de IL-10, quando comparadas ao controle não estimulado. Além disso, apenas o grupo CAF apresentou aumento significativo tanto de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quanto de TCD8<sup>+</sup> produtores de IL-10, em relação ao controle PBS (Figura 10A e B). Na avaliação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IFN-γ, observamos um aumento significativo apenas no grupo imunizado com CAF em relação ao grupo controle PBS, já o grupo imunizado com LaAg apresentou uma significativa redução dessas células quando

comparado ao controle PBS (Figura 10C). Conforme observamos na figura 10D, apenas o grupo imunizado com LaAg associado ao CAF, quando reestimulado *in vitro*, apresentou um aumento significativo de linfócitos TCD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  quando comparados ao controle não estimulado.

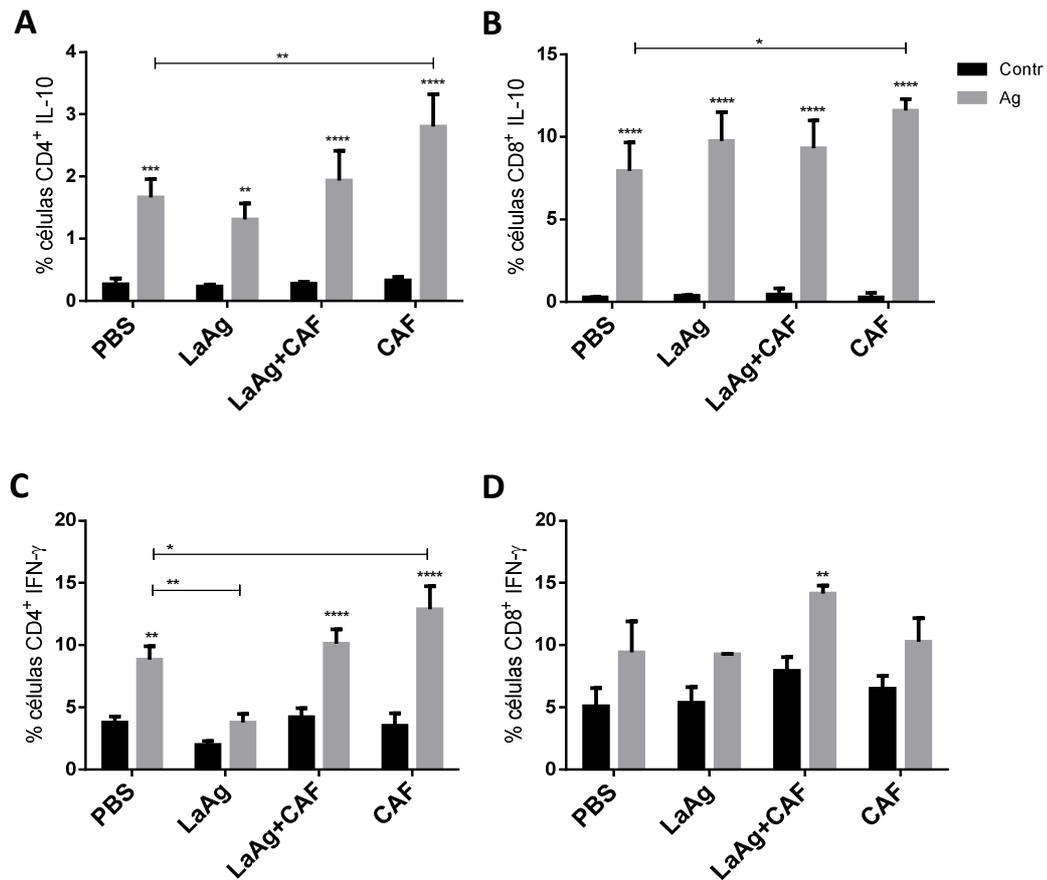


Figura 10: Análise da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-10. Esplenócitos de animais eutanasiados 1 dia após o reforço e reestimulados *in vitro* com LaAg por 96 horas foram avaliados para definir a porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IL-10 (A) e IFN- $\gamma$  (C) e de linfócitos TCD8<sup>+</sup> produtores de IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (D) por citometria de fluxo. \* p<0,05 em relação ao controle PBS. \*\* p<0,01 em relação ao controle interno. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\* p<0,001 em relação ao controle PBS. \*\*\*\* p<0,0001 em relação aos controles interno e PBS.

Depois de avaliarmos a imunidade celular, nos propusemos a avaliar a produção de IgG total e subclasses IgG1 e IgG2a dos camundongos frente aos diferentes protocolos vacinais. Dessa forma, animais vacinados foram eutanasiados 24 horas após a 2<sup>a</sup> dose vacinal e tiveram o soro coletado para determinarmos a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a.

Como ilustrado na figura 11, observamos que a vacinação intranasal com LaAg livre ou associado ao CAF induziu um aumento significativo na produção de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania* quando comparados ao grupo controle PBS e ao grupo que recebeu somente o adjuvante.

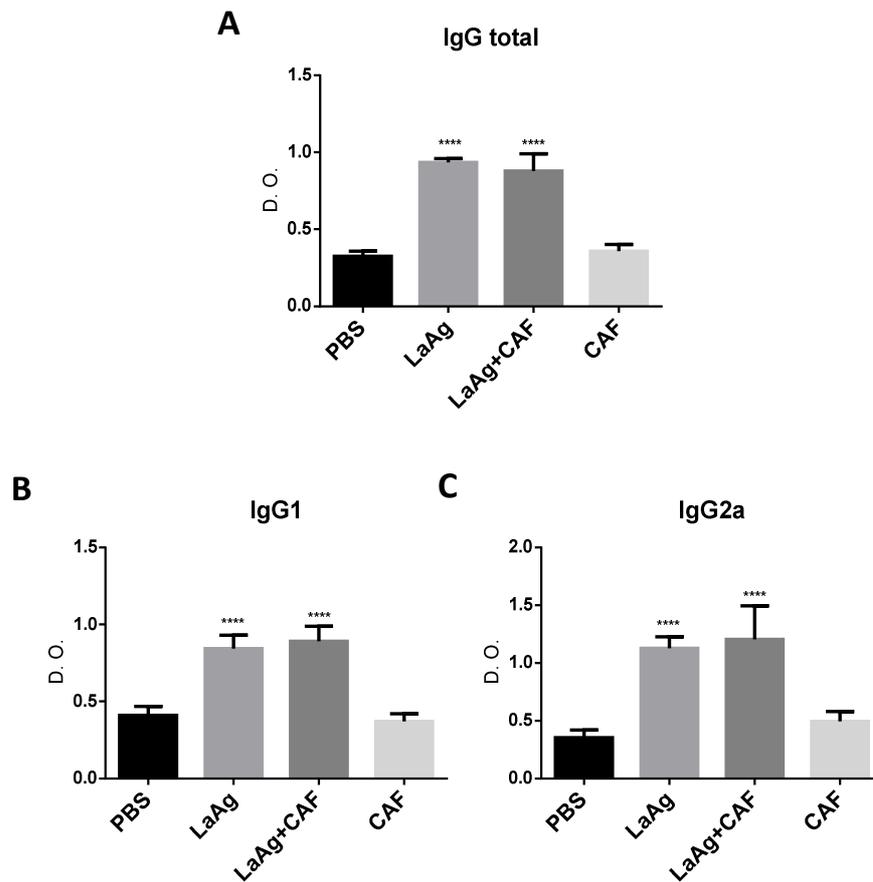


Figura 11: A vacinação com LaAg promove a produção de anticorpos específicos. Produção de Ac anti-*Leishmania* no soro de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com PBS, LaAg, LaAg associado ao CAF ou CAF em duas doses intervaladas por 14 dias e eutanásia 24 horas após o reforço. A dosagem de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) foi determinada por Elisa. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo PBS e ao grupo CAF.

## 5.5. Imunidade Protetora

Após a análise da imunogenicidade gerada pela vacinação, avaliamos se as imunizações protegeriam os animais após o desafio. Iniciamos com a análise *ex vivo* das populações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais e de memória no baço.

Os resultados indicaram um perfil semelhante e sem diferença significativa entre linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> totais e entre as células de memória de todos os grupos, como mostrado na figura 12.

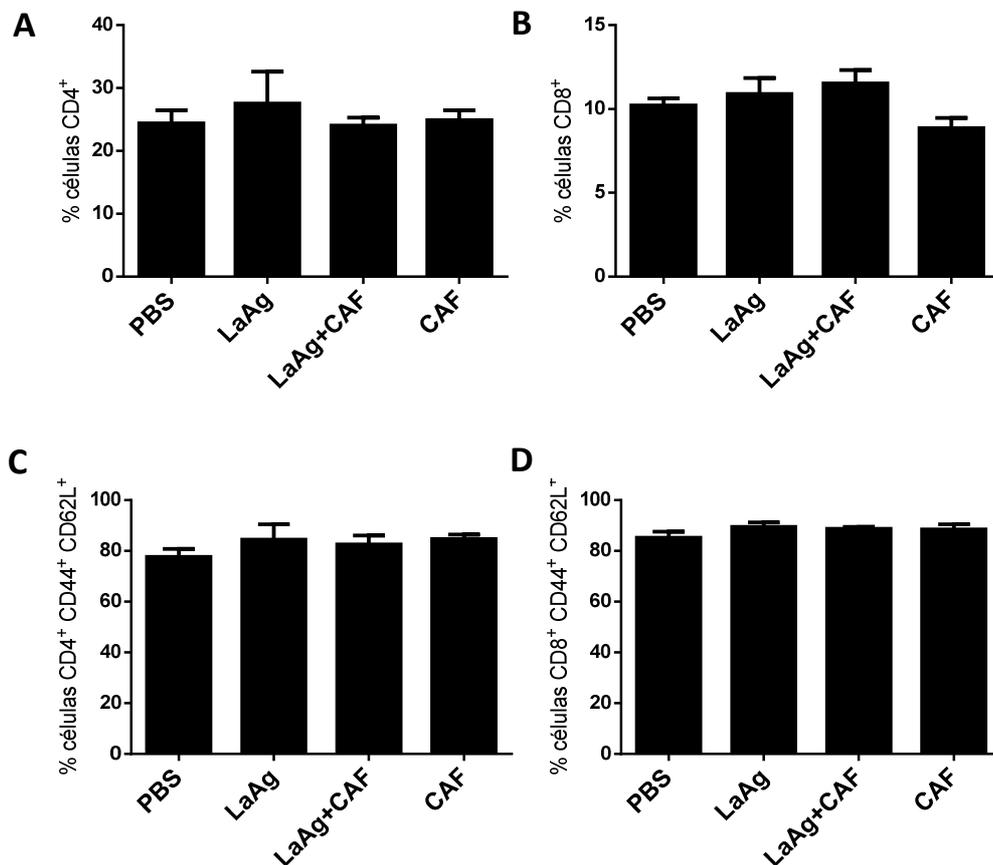


Figura 12: Análises *ex vivo* das populações de linfócitos T. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> (B) totais e de memória TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (C) e TCD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (D) no baço de animais, 15 dias após a infecção com *L. chagasi*. O resultado representa a média de três experimentos.

Após a análise *ex vivo* das populações de linfócitos, passamos a análise da proliferação de esplenócitos estimuladas *in vitro* com o antígeno vacinal. Conforme a figura 13, os grupos vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF apresentaram índices de proliferação significativamente maiores quando comparados ao grupo controle PBS. Além disso, o reestímulo com LaAg *in vitro* promoveu aumento significativo dos índices de proliferação nestes mesmos grupos quando comparados aos controles não estimulados.

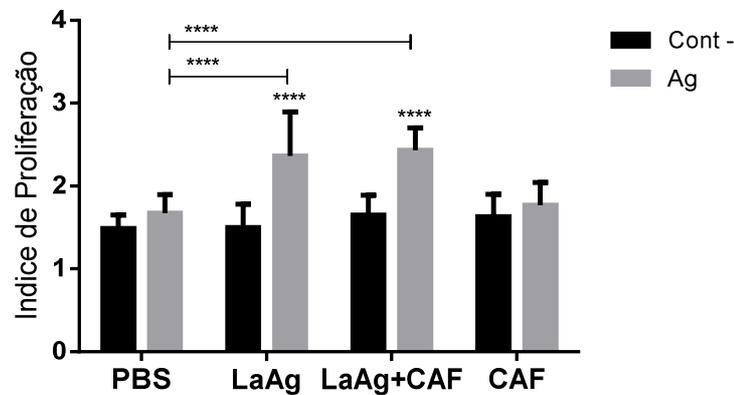


Figura 13: Avaliação das respostas linfoproliferativas após infecção com *L. chagasi*. Resposta linfoproliferativa de esplenócitos marcados com CFSE e reestimulados com LaAg *in vitro* de camundongos BALB/c sacrificados 15 dias após a infecção com *L. chagasi*. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressa em índice de proliferação celular (IP). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles.

Após a análise da proliferação celular, passamos para a avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por ELISA sanduíche e de NO pelo método de Griess nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos de animais vacinados e controles após desafio, reestimulados *in vitro* com LaAg. Como mostra a figura 14, a imunização intranasal promoveu aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de animais imunizados com LaAg livre ou associado ao CAF, quando comparado ao grupo PBS. Observamos também uma proliferação significativa dos grupos LaAg, LaAg associado ao CAF, bem como do grupo CAF em resposta ao estímulo específico. Além disso, não verificamos diferenças estatisticamente significativas nas produções de IL-10, IL-4 e NO por esplenócitos dos animais vacinados ou controles, em resposta ao reestímulo com antígeno (dados não mostrados).

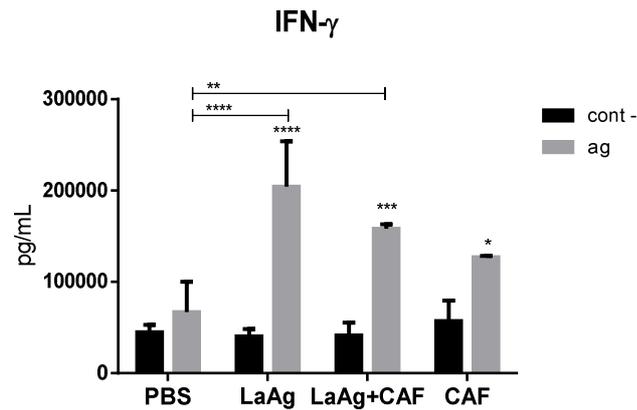


Figura 14: Efeito da vacinação intranasal sobre a produção de IFN- $\gamma$  após desafio *in vivo*. Produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com LaAg livre ou associado ao CAF ou com adjuvante livre e desafiados com *L. chagasi* 2 semanas após o reforço. Os animais foram eutanasiados 15 dias após o desafio para retirada de esplenócitos que foram posteriormente reestimulados *in vitro* com 50 $\mu$ g/mL de LaAg. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche. O resultado representa a média de três experimentos. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles não estimulados.

Uma vez determinada alguns aspectos da imunidade celular, passamos então para a avaliação da resposta humoral dos animais vacinados e desafiados com *L. chagasi*. Para isso, o soro dos animais foram coletados para determinarmos a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a no dia da eutanásia.

Como ilustrado na figura 15, observamos um aumento significativo na produção de IgG total, IgG1 e IgG2a pelos animais vacinados com LaAg livre e LaAg associado ao CAF, quando comparados ao grupo controle PBS e ao grupo CAF.

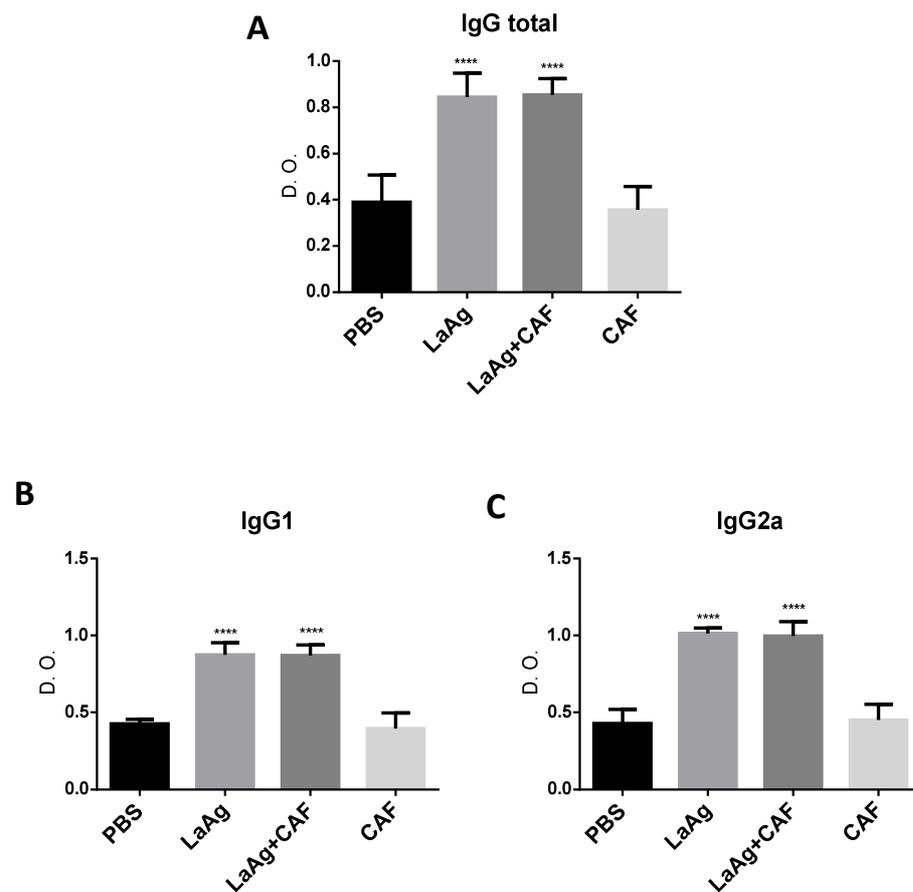


Figura 15: Avaliação da resposta humoral. Dosagem de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) por Elisa no soro dos animais do grupo controle e vacinados com duas doses da vacina LaAg livre ou associada ao CAF pela via intranasal, 15 dias após o desafio (imunidade protetora). O resultado representa a média de três experimentos. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo PBS e ao grupo CAF.

Nossa última análise foi avaliar o efeito da vacinação com as formulações sobre a capacidade protetora. Conforme podemos observar na figura 16, a imunização com LaAg associada ao CAF foi capaz de promover reduções significativas no parasitismo do fígado dos animais em comparação a todos os outros grupos. Já no baço, há uma redução significativa da carga parasitária no grupo LaAg associado ao CAF quando comparado aos grupos controle PBS e ao grupo LaAg. De forma interessante, o grupo vacinado com CAF apresentou cargas menores quando comparado ao PBS, para ambos os órgãos.

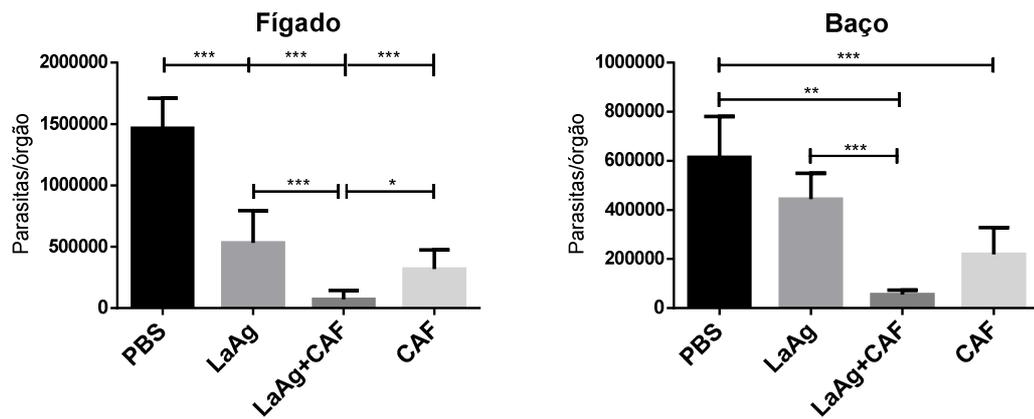


Figura 16: Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* após imunização. Número de parasitas no fígado e baço de animais imunizados por via intranasal em duas doses intervaladas por 7 dias. Os animais foram infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. chagasi* em veia caudal 7 dias após a 2ª dose da imunização e eutanasiados 2 semanas após a infecção. A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (LDA). O resultado representa a média de três experimentos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo CAF. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle PBS. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controle PBS e LaAg.

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave dentre o largo espectro de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, negligenciada pelas autoridades e responsável por grandes impactos na saúde pública. Muito embora o Ministério da Saúde venha executando medidas para o controle da leishmaniose visceral, ainda assim tais estratégias não têm apresentado resultados satisfatórios. Com isso, novas medidas preventivas devem ser reconsideradas de forma a se obter um melhor controle na prevenção de novos casos.

O desenvolvimento de vacinas envolvendo vários candidatos promissores que tenham eficácia contra a leishmaniose visceral tem sido feito por agências e universidades nacionais e internacionais (KHAMESIPOUR A *et al*, 2006). Dentre eles, a administração por via de mucosa com LaAg, que foi previamente demonstrada por nosso grupo em modelos experimentais de infecção por *L. amazonensis* (PINTO EF *et al*, 2003). Neste trabalho, objetivamos estudar a mesma vacina de antígeno total bruto de *L. amazonensis* (LaAg), em associação com o adjuvante CAF, inédito em estudos contra a leishmaniose visceral.

Iniciamos os estudos pela avaliação da biossegurança e imunogenicidade gerada após as duas imunizações, seguida pela avaliação da imunidade protetora frente ao desafio *in vivo* com *L. chagasi*. A escolha da via intranasal para a administração foi baseada em estudos de nosso grupo, que já demonstraram ser esta uma via efetiva e capaz de induz uma imunidade local e sistêmica contra a LV em modelos murinos e de hamster (GOMES D *et al*, 2007). Além disso, utilizamos a associação da vacina ao CAF, um adjuvante previamente avaliado quanto ao seu efeito sobre as células epiteliais da mucosa, onde foi demonstrada a manutenção da viabilidade e integridade de células Calu-3 após sua utilização (CHRISTENSEN D *et al*, 2010). Nossos resultados demonstraram que a utilização da vacina associada ao CAF não alterou parâmetros séricos de ALT, AST e creatinina (figura 5). De acordo com Ennulat e colaboradores (2010), o ALT e AST são aminotransferases amplamente encontradas em muitos tecidos do corpo e que são liberadas na corrente sanguínea quando estes tecidos são lesados, por isso, os valores de ALT e AST são rotineiramente utilizados no monitoramento de lesões cardíacas e hepáticas (ENNULAT D *et al*, 2010). De acordo com Adler (2010), a creatinina é um produto

da degradação da creatina do músculo filtrada do sangue pelos rins, o que a torna biomarcadora de lesão renal. Como observamos em nossos resultados (Fig.3), não houve indícios de alteração cardíaca, hepática ou renal nos animais vacinados com LaAg, LaAg associado ao CAF ou apenas CAF, o que mostra ser esta uma vacina segura. De forma diferente, o grupo onde o CCl<sub>4</sub> foi injetado pela via intraperitoneal apresentou aumento de todos os marcadores, o que já era esperado, uma vez que essa molécula é de toxicidade comprovada e pode levar o animal a morte (LEE C *et al*, 2007).

Após os testes de biocompatibilidade da vacina, passamos a avaliar os efeitos imunogênicos e protetores em nosso modelo. Primeiro analisamos a percentagem total dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e também as subpopulações de memória *ex vivo* (TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>), já que uma vacina eficaz deve ser capaz de promover a geração da memória imunológica (ELY KH *et al*, 2006). A memória imunológica pode ser entendida como uma resposta diferenciada, mais rápida e mais forte de um animal que entra em contato com um antígeno pela segunda vez (DUTTON RW *et al*, 1998). A estimulação *in vitro* dos linfócitos com antígenos ou mitógenos pode modular a expressão das moléculas CD62L e CD44 nas células T ativadas (CHAO CC *et al*, 1994; HAMANN AD *et al*, 1988; JUNG TM *et al*, 1988). Essa modulação foi vista em nosso estudo conforme a figura 9, onde esplenócitos de animais vacinados com o LaAg livre ou associado ao CAF, após reestímulo *in vitro*, apresentaram um aumento da população de linfócitos T de memória (TCD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>). Já a percentagem de células TCD4<sup>+</sup> apresentou tendência de aumento para todas as células reestimuladas, indicando que o antígeno pode ter induzido a expansão clonal das mesmas. De forma diferente, as células TCD8<sup>+</sup> apresentaram expansão apenas nos grupos que receberam o adjuvante, revelando um aumento significativo possivelmente induzido pelo CAF (figura 9). A avaliação de linfócitos isolados de animais no dia da eutanásia (*ex-vivo*) que não foram reestimulados com o antígeno *in vitro* não apresentaram essa modulação (figura 6 e 12), sugerindo a necessidade do estímulo com o antígeno para que possa haver alguma variação na expressão dessas moléculas como descrito por HAMANN (1988) e JUNG (1988) .

Prosseguimos nossos estudos com a avaliação da proliferação específica induzida pela vacina *in vitro*. Como já descrito, uma resposta deficitária ou anérgica de células T antígeno específicas tem sido descrita durante a LV, e correlacionada ao

desenvolvimento da doença ativa (GARG R *et al.*, 2006; MELBY PC *et al.*, 2001). Conforme nossos dados demonstram, grupos controle que não apresentaram respostas linfoproliferativas apresentaram altos índices de parasitismo. Por outro lado, grupos vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF apresentaram um perfil diferente (figuras 7 e 13), corroborando com estudos de Lakshmi e colaboradores (2014), que também observaram um aumento da proliferação de esplenócitos em cultura estimulados com o antígeno solúvel da *Leishmania* em animais previamente imunizados (LAKSHMI BS *et al.*, 2014). Essa capacidade linfoproliferativa *in vitro* tem indicado o sucesso de vacinas contra a infecção por *Leishmania* (ALI SA *et al.*, 2009).

Além da resposta linfoproliferativa, a resistência à leishmaniose visceral tem sido correlacionada com uma resposta predominante do tipo Th1, com aumento da produção de IFN- $\gamma$  resultando na ativação de macrófagos e morte do parasita (SACKS D *et al.*, 2002; MANSUETO P *et al.*, 2007; NYLEN S *et al.*, 2010). A produção de IL-4 tem-se demonstrado necessária para uma otimização da resposta Th1, incluindo a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  durante a quimioterapia (ALEXANDER J *et al.*, 2000), papel esse que difere no modelo de leishmaniose cutânea murina causada por *L. amazonenses*, em que a IL-4 tem-se relacionado ao agravamento da doença. E por último, a ausência ou presença de baixos níveis da citocina imunorreguladora IL-10 também se correlaciona ao controle da LV, pois essa citocina suprime a produção do IFN- $\gamma$ , inibindo a ativação de macrófagos (BASU R *et al.*, 2005). Além disso, a presença dessa citocina pode também diminuir a apresentação de Ag pelas CDs e a ativação de células T de forma direta (COUPER KN *et al.*, 2008).

No nosso trabalho, o estímulo *in vitro* com antígeno LaAg foi capaz de induzir um aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de animais vacinados com LaAg livre ou associado ao adjuvante CAF como observamos na figura 8<sup>a</sup> e 14, isso indica que o antígeno pode ser capaz de induzir a produção do IFN- $\gamma$ , importante na proteção dos animais contra a infecção contra *L. amazonenses* (PINTO EF *et al.*, 2003). Além disso, o resultado da associação da vacina com o adjuvante CAF corrobora o estudo de Christensen e colaboradores (2010) que demonstrou que o adjuvante é capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  por animais

imunizados com Vaxigrip em até quatro vezes mais quando o mesmo é administrado junto à vacina.

No nosso trabalho, os dados relacionados à produção de IL-4 e IL-10 não foram mostrados, pois para ambas as citocinas a dosagem tanto em ensaios de imunogenicidade quanto de imunidade protetora não demonstraram alterações. Semelhante às dosagens de IL4 e IL-10, a produção de NO não foi significativa entre nenhum dos grupos, e apenas nos ensaios de imunogenicidade observamos um produção aumentada em animais imunizados com LaAg livre ou associado ao CAF quando comparados aos esplenócitos não estimulados (figura 8B). Como já descrito, a eliminação de *Leishmania* dos macrófagos requer a ativação dessa célula e liberação de vários metabólitos tóxicos do oxigênio como o NO, levando à morte da *Leishmania* (LIEW FY *et al*, 1990; ASSREUY J *et al*, 1994). Desta forma, a diminuição do parasitismo, observada em nossos experimentos poderia não ser correlacionada à produção de NO e sim a outro mecanismo leishmanicida, como a produção de outros metabólitos tóxicos como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, não avaliados em nosso trabalho.

Como descrevemos na figura 10, o estímulo *in vitro* com o LaAg promoveu um aumento da percentagem tanto de células TCD4<sup>+</sup> quanto de TCD8<sup>+</sup> produtoras de IL-10 em relação às células não reestimuladas, o que pode indicar a presença do misto de citocinas tanto do perfil Th1 quanto de Th2 no estabelecimento da infecção como já tem sido descrito (HAILU A *et al*, 2005). O aumento de células T produtoras de IL-10 entre grupos foi significativa apenas quando relacionamos o controle PBS e CAF, o que pode indicar uma não especificidade deste adjuvante. Além disso, a porcentagem de células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  foi significativamente maior no grupo CAF, mostrando mais uma vez o alto poder que este adjuvante apresenta em ativar as células a produzirem citocinas.

De acordo com Brandtzaeg (2010), a vacinação realizada pela via mucosa pode desencadear tanto a imunidade celular quanto a imunidade humoral sistêmica. Desta forma, avaliamos as dosagem das imunoglobulinas IgG total e específicas, IgG2a e IgG1 e observamos em nossos resultados de imunogenicidade, bem como após o desafio, que animais vacinados com a LaAg livre ou associado ao adjuvante apresentaram um aumento de IgG total, IGg2a e IgG1 em relação ao controle PBS

ou CAF (figura 11 e 15), sugerindo que a vacina poderia gerar uma resposta imune humoral protetora no combate à *L. chagasi* (BHOWMICK S *et al*, 2008).

Além disso, animais vacinados com LaAg livre e associado ao CAF ou só com o CAF apresentaram reduções significativas no parasitismo do baço e fígado (Fig 15). A avaliação da carga parasitária em ambos os órgãos é um marcador importante da vacina contra LV, em vista do fato de que uma resposta imune órgão-específica foi observada após infecção com *Leishmania* viscerotrópica, administradas por via intravenosa, intradérmica ou subcutânea em camundongos (GARG R *et al*, 2006).

A diminuição da carga parasitária observada na figura 16 do nosso grupo imunizado com LaAg associado ao CAF pode estar correlacionada com a maior produção de IFN- $\gamma$  por estes animais, uma citocina chave que protege os animais da infecção por *Leishmania* (WILSON ME *et al*, 2005). Os nossos resultados mostraram que o IFN- $\gamma$  foi detectado no sobrenadante de esplenócitos de animais imunizados com LaAg associado ao CAF após reestimulação *in vitro*, diferente do encontrado para o grupo controle PBS que mesmo com a reestimulação não apresentou uma produção significativamente maior da citocina. Tanto células TCD4<sup>+</sup> quanto TCD8<sup>+</sup> contribuem para a produção de IFN- $\gamma$ , e no caso o grupo imunizado com LaAg associado ao CAF foi o único que apresentou um aumento significativo da percentagem tanto de células TCD4<sup>+</sup> quanto de TCD8<sup>+</sup> frente ao reestímulo *in vitro*, o que pode ter contribuído para a maior proteção observada nesse grupo. Observamos também, que a proliferação celular específica para os antígenos da *Leishmania* foi significativamente maior também nos grupos imunizados com LaAg livre e associado ao CAF. Diferente dos grupos controle PBS e CAF que não apresentaram diferença nos títulos de IgG total, IgG1 e IgG2a, os grupos imunizados com LaAg livre e associado ao CAF mostraram uma maior produção de anticorpos específicos.

Essa ativação celular que observamos pode ter sido importante para o controle do parasitismo nos órgãos dos animais protegidos (figura 16), uma vez que a resposta Th1 específica aos antígenos e a resposta celular TCD8<sup>+</sup> foram relacionadas com a proteção contra *L. donovani* em camundongos vacinados com as proteínas purificadas gp63 e DP72 (BHOWMICK S *et al*, 2008; RACHAMIM N *et al*, 1993). Isto também foi observado em camundongos imunizados com vacinas de células híbridas composta de macrófagos que expressam a proteína de membrana KMP-11 (BASU R *et al*, 2007).

O uso do adjuvante CAF em combinação com LaAg parece ser uma atrativa alternativa na indução de imunidade humoral e celular. O sucesso do uso do adjuvante por via intranasal já foi demonstrado em outros modelos de infecção. Porém, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar sua eficácia na indução de imunogenicidade e na resposta protetora na leishmaniose visceral experimental, e os resultados demonstram que esta combinação foi segura para os animais e que promoveu a proteção dos mesmos frente ao desafio com *L. chagasi* por promover uma resposta imune protetora com alta proliferação de células T específicas, aumento da produção de IFN- $\gamma$ , presença de células de memória e altos títulos de anticorpos.

**CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram evidências importantes da imunização intranasal com LaAg associado ao CAF e sua utilização contra a leishmaniose visceral. Assim, podemos concluir que:

- ✓ A vacinação intranasal com LaAg/CAF não apresentou toxidez sistêmica e demonstrou ser, o CAF, um importante candidato a adjuvante associado a vacinas contra leishmaniose.
- ✓ A associação do LaAg ao CAF e sua administração por via i.n. promoveu aumento de células TCD4<sup>+</sup> de memória, maior proliferação de células T específicas e aumento da produção de IFN- $\gamma$  e NO frente ao reestímulo *in vitro*, além de uma resposta imune humoral indicando uma resposta imune mista.
- ✓ A imunização com LaAg associado ao CAF em camundongos desafiados com *L. chagasi* promoveu a diminuição da carga parasitária em baço e fígado, modulando positivamente a resposta imune protetora nos animais vacinados.

Nós demonstramos que a administração do LaAg pela via nasal foi capaz de promover uma resposta sistêmica ao antígeno e que a associação do adjuvante CAF à formulação induziu aumento da imunidade tanto celular quanto humoral, contribuindo para a proteção de camundongos BALB/c contra a LV.

## **REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

1. ADLER, S. Novel kidney injury biomarkers. **Journal of renal nutrition: the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation**, v. 20, p. S15–S18, 2010.
2. AFONSO, L. C. et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 263, n. 5144, p. 235–7, 14 jan. 1994.
3. AFRIN, F.; ALI, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. **Infection and immunity**, v. 65, n. 6, p. 2371–7, jun. 1997.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual: Leishmaniose Visceral**. Brasília – DF, 2007.
5. AGGER, E. M. et al. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. **PloS one**, v. 3, n. 9, p. e3116, jan. 2008.
6. AL TUWAIJRI, A S.; AL MOFLEH, I. A; MAHMOUD, A A. Effect of *Leishmania major* on human polymorphonuclear leucocyte function in vitro. **Journal of medical microbiology**, v. 32, n. 3, p. 189–93, jul. 1990.
7. ALEXANDER, J. et al. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **European journal of immunology**, v. 30, n. 10, p. 2935–43, out. 2000.
8. ALHALAWEH, A.; ANDERSSON, S.; VELAGA, S. P. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 206–14, 8 out. 2009.
9. ALI, S. A. et al. CTL responses to *Leishmania mexicana* gp63-cDNA vaccine in a murine model. **Parasite immunology**, v. 31, n. 7, p. 373–83, jul. 2009.
10. AMIN, M.; JAAFARI, M. R.; TAFAGHODI, M. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 225–9, 1 nov. 2009.
11. AMORIJ, J.-P. et al. Needle-free influenza vaccination. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 699–711, out. 2010.
12. ANTONELLI, L. R. V et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and experimental immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–8, maio 2004.

13. ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **European journal of immunology**, v. 24, n. 3, p. 672–6, mar. 1994.
14. AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian journal of medical research**, v. 119, n. 6, p. 238–58, jun. 2004.
15. BASANOVA, A. V; BASKOVA, I. P.; ZAVALOVA, L. L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 67, n. 1, p. 143–50, jan. 2002.
16. BASU, R. et al. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13. **Infection and immunity**, v. 75, n. 12, p. 5956–66, dez. 2007.
17. BASU, R. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: ev. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 11, p. 7160–71, 1 jun. 2005.
18. BEIL, W. J. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 52, n. 2, p. 135–42, ago. 1992.
19. BELKAID, Y. et al. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6704–9, 6 jun. 2000.
20. BHAUMIK, S. K.; NASKAR, K.; DE, T. Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10. **European journal of immunology**, v. 39, n. 8, p. 2146–60, ago. 2009.
21. BHOWMICK, S.; ALI, N. Identification of novel *Leishmania donovani* antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5820, jan. 2009.
22. BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 1003–15, mar. 2008.
23. BRANDTZAEG, P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. **Immunological investigations**, v. 39, n. 4-5, p. 303–55, jan. 2010.
24. BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467–84, 26 jul. 2007.

25. BRANDTZAEG, P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 12, p. 1595–604, 15 jun. 2011.
26. BRAY, R. S. Immunodiagnosis of leishmaniasis. **Immunology of Parasitic Infections. Blackwell Scientific Publications**, p. 65-76, 1976.
27. BRAY, R. S.; MODABBER, F. The history of leishmaniasis. In: Gilles HM, editor. **Protozoal Diseases**. p. 414–9, 2000.
28. BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641–54, ago. 2005.
29. CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 6, p. 4144–8, dez. 1985.
30. CHAO, C. C.; SANDOR, M.; DAILEY, M. O. Expression and regulation of adhesion molecules by gamma delta T cells from lymphoid tissues and intestinal epithelium. **European journal of immunology**, v. 24, n. 12, p. 3180–7, dez. 1994.
31. CHRISTENSEN, D. et al. CAF01 liposomes as a mucosal vaccine adjuvant: In vitro and in vivo investigations. **International journal of pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 19–24, 5 maio 2010.
32. COLER, R. N. et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. **Infection and immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–54, set. 2007.
33. CONVIT, J. et al. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, v. 1, n. 8530, p. 401–5, 21 fev. 1987.
34. CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603–10, jan. 1972.
35. COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 5771–7, 1 maio 2008.
36. DAVID, J.; MORTARI, F. Chemokine receptors A brief overview. v. 1, p. 105–125, 2000.
37. DAVIDSEN, J. et al. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate)-a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1718, n. 1-2, p. 22–31, 10 dez. 2005.
38. 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, 5 mar. 1999.

39. DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 201–23, jan. 1998.
40. ELY, K. H. et al. Memory T cell populations in the lung airways are maintained by continual recruitment. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 1, p. 537–43, 1 jan. 2006.
41. ENNULAT, D. et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 116, p. 397–412, 2010.
42. FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–95, 29 out. 2008.
43. FERRO, C. et al. Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of medical entomology**, v. 32, n. 4, p. 527–37, jul. 1995.
44. FITZGERALD-BOCARSLY, P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. **BioTechniques**, v. Suppl, p. 16–20, 22, 24–9, out. 2002.
45. FOULDS, K. E.; WU, C.; SEDER, R. A. Th1 memory: implications for vaccine development. **Immunological reviews**, v. 211, p. 58–66, jun. 2006.
46. FUJIHACHI, K.; MCGHEE, J. R. Th1/Th2/Th3 Cells for regulation of mucosal immunity, tolerance and inflammation. **Mucosal Immunology (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, p. 539-58, 2005.
47. GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 439–54, mar. 2006.
48. GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324–9, jul. 1993.
49. GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 59–66, 12 out. 2001.
50. GOMES, D. C. DE O. 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, 8 mar. 2007.
51. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.
52. GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–50, jul. 1993.
53. GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of

- parasites to macrophages. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100–11, jan. 2008.
54. GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 927–74, jan. 2000.
  55. 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*. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 117, n. 2, p. 182–91, nov. 2005.
  56. HAMANN, A. et al. Regulation of lymphocyte homing. I. Alterations in homing receptor expression and organ-specific high endothelial venule binding of lymphocytes upon activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 140, n. 3, p. 737–43, 1 fev. 1988.
  57. HANDMAN, E.; SPIRA, D. T. Growth of *Leishmania amastigotes* in macrophages from normal and immune mice. **Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, v. 53, n. 1, p. 75–81, 25 ago. 1977.
  58. HAWKING, F. Growth of protozoa in tissue culture. V. *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 4, p. 545–54, 1948.
  59. HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505–9, 1 maio 1993.
  60. HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740–5, 7 dez. 2000.
  61. HILGERS, L. A. T.; WESTSTRATE, M. W. Stabilized adjuvant suspension comprising dimethyldioctadecylammoniumbromide. US 5,026,546, 1991.
  62. JABBAL-GILL, I. Nasal vaccine innovation. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 10, p. 771–86, dez. 2010.
  63. JULIA, V.; RASSOULZADEGAN, M.; GLAICHENHAUS, N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5286, p. 421–3, 18 out. 1996.
  64. JUNG, T. M. et al. Down-regulation of homing receptors after T cell activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 141, n. 12, p. 4110–7, 15 dez. 1988.
  65. KAISHO, T.; AKIRA, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. **Trends in immunology**, v. 22, n. 2, p. 78–83, mar. 2001.
  66. KAMHAWI, S. et al. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5495, p. 1351–4, 17 nov. 2000.
  67. KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, jan. 2000.

68. KANG, M. L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 857–65, [s.d.].
69. KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, v. 133 Suppl, p. S87–112, jan. 2006.
70. KELSALL, B. L.; LEON, F.; SMYTHIES, L. E.; SMITH, P. D. Antigen handling and presentation by mucosal dendritic cells and macrophages. **Mucosal Immunology (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, p. 451-85, 2005.
71. KEMP, K. et al. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 116, n. 3, p. 500–4, jun. 1999.
72. KENNEY, R. T. et al. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 8, p. 4481–8, 15 out. 1999.
73. KHALIL, E. A. et al. Autoclaved Leishmania major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **Lancet**, v. 356, n. 9241, p. 1565–9, 4 nov. 2000.
74. KHALIL, E. A. G. et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 140, n. 2, p. 349–53, maio 2005.
75. KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 423–38, mar. 2006.
76. KIYONO, H.; FUKUYAMA, S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 9, p. 699–710, set. 2004.
77. KOBAYASHI, M. et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 3, p. 827–45, 1 set. 1989.
78. KRIEG, A. M. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. **Vaccine**, v. 19, n. 6, p. 618–22, 8 nov. 2000.
79. KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 8, p. 1000–2, jun. 2005.
80. KUNKEL, E. J.; CAMPBELL, D. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 10, n. 3-4, p. 313–23, jun. 2003.
81. LAKSHMI, B. S.; WANG, R.; MADHUBALA, R. Leishmania genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a

- novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 32, n. 30, p. 3816–22, 7 maio 2014.
82. LECLERC, C. New approaches in vaccine development. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 26, n. 5-6, p. 329–41, out. 2003.
  83. LEE, C.-H. et al. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, p. 1898–1904, 2007.
  84. LEFRANÇOIS, L. Cytotoxic T cells of the mucosal immune system. **(Third Edition)**. Burlington: Academic Press, p. 559-64, 2005. DOI: 10.1016/B978-012491543-5/50033-4
  85. LERNER, E. A.; SHOEMAKER, C. B. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 2, p. 1062–6, 15 jan. 1992.
  86. LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 12, p. 4794–7, 15 jun. 1990.
  87. MACPHERSON, G.; KUSHNIR, N.; WYKES, M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. **Immunological reviews**, v. 172, p. 325–34, dez. 1999.
  88. MADHI, S. A. et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 4, p. 289–98, 28 jan. 2010.
  89. MANSUETO, P. et al. Immunopathology of leishmaniasis: an update. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 435–45, [s.d.].
  90. MARZOCHI, K. B. et al. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 205–12, [s.d.].
  91. MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, [s.d.].
  92. MAYRINK, W. et al. Short report: evaluation of the potency and stability of a candidate vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 2, p. 294–5, ago. 1999.
  93. MCMAHON-PRATT, D. et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. **Infection and immunity**, v. 61, n. 8, p. 3351–9, ago. 1993.
  94. MELBY, P. C. et al. Leishmania donovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, set. 2001.
  95. MESTECKY, J.; RUSSELL, M. W. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA

- at mucosal surfaces. **Immunology letters**, v. 124, n. 2, p. 57–62, 4 jun. 2009.
96. 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, 5 fev. 1999.
  97. MUTISO, J. M. et al. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. **Journal of biomedical research**, v. 27, n. 2, p. 85–102, mar. 2013.
  98. NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–8, fev. 2008.
  99. NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–88, out. 2011.
  100. NEOGY, A. B. et al. Antibody kinetics in kala-azar in response to treatment. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 81, n. 6, p. 727–9, dez. 1987.
  101. NOGUEIRA, F. S. et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of Leishmania parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805–10, 23 set. 2005.
  102. NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–46, maio 2010.
  103. OLIVA, G. et al. Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318–22, abr. 2006.
  104. PAHO. Leishmaniasis: WHO report 2013. **Pan American Health Organization**, 2013.
  105. PARAGUAI DE SOUZA, E. et al. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of Leishmania donovani. **Vaccine**, v. 19, n. 23-24, p. 3104–15, 30 abr. 2001.
  106. PINTO, E. F. et al. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p. 4521–7, ago. 2004.
  107. 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, 8 set. 2003.
  108. POMPEU, M. L. et al. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by Leishmania amazonensis. A quantitative approach. **Acta tropica**, v. 48, n. 3, p. 185–93, jan. 1991.
  109. RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L. Pure protein from Leishmania donovani protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **Journal**

- of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 6, p. 2322–31, 15 mar. 1993.
110. RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. Leishmania major: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 85, n. 3, p. 283–95, mar. 1997.
  111. REMALEY, A. T. et al. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 18, p. 11173–5, 25 set. 1984.
  112. RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143–52, set. 1995.
  113. RIBEIRO, J. M. et al. Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) and Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 5, p. 743–7, set. 2000.
  114. RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 31, n. 1, p. 143–8, jan. 1998.
  115. RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, fev. 2012.
  116. ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite immunology**, v. 25, n. 3, p. 127–34, mar. 2003.
  117. ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463–7, 22 jul. 2004.
  118. ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 5, p. 495–507, maio 2002.
  119. SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–58, nov. 2002.
  120. SALDARRIAGA, O. A. et al. Selective enhancement of the type 1 cytokine response by expression of a canine interleukin (IL)-12 fused heterodimeric DNA. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 377–88, 15 abr. 2006.
  121. SAMANT, M. et al. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of Leishmania donovani generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 1, p. 470–9, 1 jul. 2009.

122. 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, 22 nov. 2002.
123. SATTI, I. N. et al. Immunogenicity and safety of autoclaved *Leishmania major* plus BCG vaccine in healthy Sudanese volunteers. **Vaccine**, v. 19, n. 15-16, p. 2100–6, 28 fev. 2001.
124. 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. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–77, 1 ago. 1993.
125. SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 893–906, 16 abr. 2007.
126. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**: Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Brasília - DF: [s.n.], 2010.
127. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília - DF: [s.n.], 2006.
128. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Situação, Espírito Santo. Brasília - DF: [s.n.], 2011.
129. SHARIFI, I. et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. **Lancet**, v. 351, n. 9115, p. 1540–3, 23 maio 1998.
130. SHIN, S. et al. Oral vaccines against cholera. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 11, p. 1343–9, jun. 2011.
131. SILVESTRE, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OUAISSI, A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 56, n. 2, p. 123–6, [s.d.].
132. SINGH, M.; SRIVASTAVA, I. Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. **Current HIV research**, v. 1, n. 3, p. 309–20, jul. 2003.
133. SKEIKY, Y. A. W. 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, 10 set. 2002.
134. SPÖRRI, R.; REIS E SOUSA, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. **Nature immunology**, v. 6, n. 2, p. 163–70, fev. 2005.
135. SUKUMARAN, B. et al. Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 21, n. 11-12, p. 1292–9, 7 mar. 2003.

136. SUNDAR, S. et al. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 176, n. 4, p. 1117–9, out. 1997.
137. SUNDAR, S.; RAI, M. Treatment of visceral leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 6, n. 16, p. 2821–9, dez. 2005.
138. TAKAHASHI, I. et al. New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 3, p. 352–8, jun. 2009.
139. TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 12, p. 8346–53, 15 dez. 2005.
140. TEWARY, P. et al. A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 12, p. 2130–7, 15 jun. 2005.
141. 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, 20 mar. 2006.
142. VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521–5, 1 dez. 2004.
143. VÉLEZ, I. D. et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 8, p. 593–8, ago. 2005.
144. VÉLEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 329–37, 11 dez. 2009.
145. VESIKARI, T. et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 1, p. 23–33, 5 jan. 2006.
146. WALKER, P. S. et al. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. **Human gene therapy**, v. 9, n. 13, p. 1899–907, 1 set. 1998.
147. WENZEL, A.; VAN ZANDBERGEN, G. Lipoxin A4 receptor dependent leishmania infection. **Autoimmunity**, v. 42, n. 4, p. 331–3, maio 2009.
148. WHO. Leishmaniasis: WHO report 2009. **World Health Organization**, 2009.
149. WHO. Leishmaniasis: WHO report 2012. **World Health Organization**, 2012.

150. WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–60, abr. 2005.
151. YAMAKAMI, K. et al. A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from Leishmania major infection. **Parasitology international**, v. 50, n. 2, p. 81–91, jul. 2001.
152. YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, nov. 2003.
153. YUKI, Y.; KIYONO, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 8, p. 1083–97, ago. 2009.
154. ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 8, p. 810–4, jun. 2001.
155. ZHANG, X. et al. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 68, n. 3, p. 526–34, mar. 2008.