



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

ANDRÉS FELIPE MÉNDEZ COREA

**USO DE ADJUVANTES (CAF 09, CAF 01 E MPL) MUCOSA-
COMPATÍVEIS NA FORMULAÇÃO DE VACINAS CONTRA A
LEISHMANIOSE VICERAL.**

**Vitória
2018**

ANDRÉS FELIPE MÉNDEZ COREA

**USO DE ADJUVANTES (CAF 09, CAF 01 E MPL) MUCOSA-
COMPATÍVEIS NA FORMULAÇÃO DE VACINAS CONTRA A
LEISHMANIOSE VICERAL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia. Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

Vitória

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço Deus, pela vida que recebi como presente e pela capacidade de tentar compreender sua criação.

A toda minha família, que me apoiou e acreditou nos meus sonhos. Em especial, ao meu pai e mãe, por serem o exemplo de amor ao próximo e de pessoas a seguir e incrível sabedoria.

À minha irmã Melissa e irmãos Pablo e Jose Enrique, pelos inúmeros gestos de carinho e pelo incentivo. Marta e Mark que torcem pelas minhas conquistas que são parte de minha família e me ajudam seguir-me esforçando. Também Ariana, Isabella e os “Super colegas” Não tenho palavras para agradecer a vocês, que me incentivaram e deram asas a minha curiosidade.

Aos meus amigos, que torcem pelas minhas conquistas e me motivam em todos os momentos, em especial ao meu amigo Estevão Barcelos, meu irmão brasileiro que me ajudou neste processo no ensinamento metódico e pela companhia e risadas, e à Régia Ferreira Martins, minha irmã brasileira pela ajuda no laboratório e pela companhia em minha pesquisa. Aprendi bastante com você.

Ao meu orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo incentivo, compreensão e ensinamentos durante esses anos e principalmente pela confiança depositada durante minha orientação.

A todos do LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira, em especial Bruna, Glênia, Renan, Caio, Régia, Juliana, Maria, Divan, Jéssica, Lorenzo e Luciana, por todos esses anos de convivência, trabalho e risadas. Foi maravilhoso aprender um pouco com cada um!

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pelo conhecimento transmitido.

Ao professor Breno Salgado pela disponibilidade e ensinamentos em minha pesquisa.

Ao professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães e Herbert Leonel de Matos Guedes, muito obrigado pela disponibilidade de participar da banca avaliadora e enriquecer com sugestões e ideias esse trabalho.

À vida de todos os animais utilizados neste trabalho. Elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

À OEA e CAPES pela bolsa concedida que permitisse minha dedicação total à pesquisa. Por fim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram e torceram pelo desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado!

“El que da el primer golpe, golpea dos veces”

Pablo Mendez Corea

“Todos en el fondo somos de ningun lado del todo y de todos lados um poco”

Jorge Drexler

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma das doenças infecto-parasitárias endêmicas em diversos países dentre deles o Brasil, que atinge os seres humanos e outros vertebrados. Seu tratamento é feito com fármacos específicos (pentavalentes antimonais, anfotericina B, pentamidinas e miltefosina) de alta toxicidade, causando efeitos colaterais nos pacientes, sendo assim é necessária uma busca por alternativas para controlar a doença. Nesse contexto, as vacinas de mucosa tem sido promissoras devido à sua especificidade na ativação do sistema imunológico associado ao baixo custo e simples administração. A vacinação por via mucosa contra leishmaniose visceral, proposto por este estudo, utiliza uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis* (LaAg) em associação com adjuvantes, como CAF01, CAF09 e MPL, os quais são eficazes em gerar uma forte resposta imunológica mediante ao estímulo de TLR1, 2, 4 e/ou TLR9. Nesse contexto, avaliamos os efeitos imunogênicos e protetores da administração intranasal de nossa vacina em camundongos BALB/c desafiados por *L. infantum chagasi*. Nossos resultados mostraram uma resposta promissora da vacina em conjunto com dois adjuvantes, CAF01 e MPL, levando a uma diminuição da carga parasitária 60 vezes menos no caso do baço e 30 vezes menos no fígado dos animais, assim como um aumento na expressão de óxido nítrico (80µM) baço e (150 µM) fígado e também a presença de citocinas inflamatórias *ex-vivo* IL-4 e IFN-γ. Observamos também um aumento na linfoproliferação de células CD8⁺ em cultura de esplenócitos. Dessa forma, podemos determinar a efetividade de nossa vacina de estudo de base em camundongos BALB/c, podendo, a partir de próximos estudos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is one of the endemic infectious-parasitic diseases in several countries, including Brazil, which affects humans and other vertebrates. Its treatment is made with specific drugs (pentavalentes antimonais, amphotericin B, pentamidines and miltefosina) of high toxicity, causing side effects in the patients, being thus a search for alternatives to control the disease is necessary. In this context, mucosal vaccines have been promising because of their specificity in the activation of the immune system associated with low cost and simple administration. The mucosal vaccination against visceral leishmaniasis, proposed by this study, uses a vaccine composed of total antigens of *L. amazonensis* (LaAg) in combination with adjuvants, such as CAF01, CAF09 and MPL, which are effective in generating a strong immune response by stimulating TLR1, 2, 4 and / or TLR 9. In this context, we evaluated the immunogenic and protective effects of intranasal administration of our vaccine in BALB / c mice challenged by *L. infantum chagasi*. Our results showed a promising response of the vaccine together with two adjuvants, CAF01 and MPL, leading to a decrease in the parasite load 60-fold and less in the case of the spleen and 30-fold less in the liver of the animals, as well as an increase in the expression of nitric oxide (80 μ M) spleen and (150 μ M) liver and also the presence of inflammatory cytokines *ex-vivo* IL-4 and IFN- γ . We also observed an increase in lymphoproliferation of CD8 + cells in splenocyte culture. Thus, we can determine the effectiveness of our base study vaccine in BALB / c mice.

LISTA DE SIGLAS

AG - Antígeno

ALRs - *AIM2-like receptors*

BALT - *Bronchus-associated lymphoid tissue*

BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*

C3b - Moléculas do complemento

CCl₄ - Tetracloreto de carbono

CAF - Lipossoma catiônico

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CpG - Citosina:fosfato:Guanina

CXCL-1 - Quimiocina (C-X-C motif) ligante 1

DCs - Células dendríticas

DAMP - Padrões moleculares associados a dano

DDA - Dimetil dioctadecil amônio

DMEM - *Dulbecco's minimal essential medium*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FAE - *Follicular associated epithelial*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GALT - *Gut-associated lymphoid tissue*

GENALT - *Genital-associated lymphoid tissue*

gp63 - Glicoproteína 63

HEV- *High endothelial venules*

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HL-60 - Linhagem celular de leucemia

iC3b - Moléculas do complemento

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

iNOS - Óxido nítrico-sintase induzível

LaAg - Antígenos totais de *L. amazonensis*

LACK - Proteína homóloga aos receptores de proteína quinase C ativada

LPG - Lipofosfoglicano

LC - Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LV - Leishmaniose visceral

M - Células micropregas

MAC - Complexo de ataque à membrana

MALT - *Mucosal Associated Linfoid Tissue*

MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos

MDSCs - Células supressoras mieloide derivadas

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

MHOM/BR/1975/PP75 - Cepa de *Leishmania infantum chagasi*

MIP - Proteína inflamatória de macrófagos

MPL - Lipídeo A monofosfórico

MS - Ministério da Saúde

NALT - *Nasal associated lymphoid tissue*

NLRs - *Nod-like receptors*

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos

PBS - Salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PKC - Proteína quinase C

PMNs - Células polimorfonucleares

PRRs - Receptor de reconhecimento padrão

PTK - Proteína tirosina quinase

RLRS - *RIG-I-like receptors*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPMI - *Roswell park memorial institute medium*

Sb5+ - Antimoniais pentavalentes

SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
T CD4⁺ - Linfócito T auxiliar
T CD8⁺ - Linfócito T citolítico
TED - Transepitelial
TDB - Trealose 6,6'-dibeenato
TGF-β - Fator de crescimento e transformação beta
TGO - Transaminase glutâmico oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico pirúvica
Th - Célula T auxiliar
TLRs - Receptores tipo Toll
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg - Células T reguladoras
WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Leishmania sp.* *Global Health – Division of Parasitic Diseases.* 2013...20
- Figura 2.** Distribuição mundial da Leishmanioses Visceral (2015) e casos clínicos no Brasil (2007). PAHO:2016..... 25
- Figura 3.** Caracterização na formulação de CAF01,CAF05 e CAF09. (A) composição estrutural, (B) diferença de componentes dos adjuvantes, (C) tamanho, índice de dispersão (PDI) e potencial de carga (zetapotencial). (KORSHOLM et al., 2014). 37
- Figura 4:** Cinética de crescimento de *L.infantum chagasi* PP75 em meio de cultura Grace's suplementado, pH 6,8. A cultura foi iniciada com uma concentração de 1×10^6 promastigotas/mL e mantida em estufa a 27°C durante 11 dias. Diariamente foi retirada uma alíquota para contagem dos parasitas e determinação da concentração cultura. 50
- Figura 5:** Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante CAF09 . Dosagem de creatinina (A) e de transaminases TGO (B) e TGP (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. O resultado representa a comparação múltipla de Tukey **** $p < 0,0001$ em relação ao controle positivo CCl_4 52
- Figura 6:** Teste de hipersensibilidade tardia em camundongos pré- vacinados. Análise da hipersensibilidade tardia de camundongos vacinados conforme descrito anteriormente, que receberam 20ug de LaAg na pata. Os dados representam o aumento do edema nos diferentes grupos. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ 53
- Figura 7.** Avaliação do parasitismo no Baço e Fígado de camundongos BALB/c vacinados e infectados. Os animais vacinados foram infectados com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum chagasi* via endovenosa. O número do parasita foi determinado no Baço e Fígado através da técnica diluição limitante (LDA), 15 dias após o reforço. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey * $p < 0,05$ 54

- Figura 8.** Produção de citocinas em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de IL-4, IL-10 e IFN γ em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L. infantum chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey experimentos com 18 animais cada. * $p < 0,05$ 55
- Figura 9.** Produção de óxido nítrico em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de NO em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L. infantum chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey experimentos com 18 animais cada. 56
- Figura 10.** Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou aos adjuvantes. Dosagem de creatinina (A) e de transaminases TGO (B) e TGP (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey **** $p < 0,0001$ em relação ao controle positivo CCl_4 59
- Figura 11.** Teste de hipersensibilidade tardia em camundongos pré- vacinados. Análise da hipersensibilidade tardia de camundongos vacinados conforme descrito anteriormente, que receberam 20ug de LaAg na pata. Os dados representam o aumento do edema nos diferentes grupos. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey * $p < 0,05$ 61
- Figura 12.** Avaliação do parasitismo no Baço e Fígado de camundongos BALB/c vacinados e infectados. Os animais vacinados foram infectados com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum chagasi* via endovenosa. O número do parasita foi determinado no Baço e Fígado através da técnica diluição limitante (LDA), 15 dias após o reforço. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ 63
- Figura 13.** Produção de citocinas em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de IL-4, IL-10 e IFN γ em sobrenadantes do baço (A) e fígado (B) de camundongos

BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L infantum. chagasi*. A significância foi determinada por teste de T test não pareado em experimento com 20 animais cada. **p<0,01 e * p<0,05..... 64

Figura 14. Produção de óxido nítrico em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de NO em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L. infantum chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey experimentos com 20 animais cada..... 65

Figura 15. Efeito da vacinação intranasal na resposta linfoproliferativa após o desafio. Esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou associado bem como o adjuvante sozinho foram coletados 24 horas após o reforço, marcados com CFSE e reestimulados *in vitro* com 20 µg/mL de LaAg por 72 horas. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressando a porcentagem de células proliferadas. O resultado representa a comparação múltipla de Dunnett ** p<0,01 em relação aos controles. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de camundongos e doses das imunizações com CAF09:433

Tabela 2: Grupos de camundongos e doses das imunizações com MPL e CAF01.444

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1. LEISHMANIOSES E ASPECTOS GERAIS | 19 |
| 1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS | 21 |
| 1.2.1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC) | 21 |
| 1.2.2. LEISHMANIOSES MUCOCUTÂNEA (LCM)..... | 21 |
| 1.2.3. LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD) | 22 |
| 1.2.4. LEISHMANIOSE VISCERAL..... | 22 |
| 1.4. RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NAS LEISHMANIOSES | 25 |
| 1.4.1. NEUTRÓFILOS..... | 26 |
| 1.4.2. MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS | 27 |
| 1.5. TRATAMENTOS | 28 |
| 1.6. VACINAS NA LEISHMANIOSE | 29 |
| 1.6.1. VACINAS DE PRIMEIRA GERAÇÃO | 29 |
| 1.6.2. VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO | 30 |
| 1.6.3. VACINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO | 31 |
| 1.7. VACINAÇÃO VIA MUCOSA NASAL | 32 |
| 1.7.1. ANTÍGENO TOTAL DE <i>Leishmania amazonensis</i> (LaAg)..... | 33 |
| 1.8. ADJUVANTES | 34 |
| 1.8.1. LIPÍDEO A MONOFOSFÓRICO (MPL) | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 1.8.2. LIPOSSOMAS DE CARGA POSITIVA (CAF)..... | 36 |
| 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS..... | 39 |
| 2.1. JUSTIFICATIVA..... | 40 |
| 2.2. OBJETIVO GERAL..... | 40 |
| 2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 40 |
| 3.MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1. ANIMAIS..... | 42 |
| 3.2. CULTIVO DE PARASITOS PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS..... | 42 |
| 3.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>L.infantum chagasi</i> | 42 |
| 3.4. PARASITOS PARA INFECÇÃO..... | 43 |
| 3.5. IMUNIZAÇÃO INTRANASAL..... | 43 |
| 3.6. DOSAGEM DE TRANSAMINASES (TGP E TGO) E CREATININA..... | 44 |
| 3.7. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DO BAÇO..... | 44 |
| 3.8. DOSAGEM DE OXIDO NÍTRICO..... | 45 |
| 3.9. PROLIFERAÇÃO CELULAR..... | 45 |
| 3.10. DOSAGEM DE CITOCINAS..... | 46 |
| 3.11. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA..... | 47 |
| 3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 47 |
| 4. RESULTADOS..... | 48 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.1. | PARTE I - AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOGÊNICAS E PROTETORAS DA VACINA LaAg ASSOCIADA AO ADJUVANTE CAF09 | 49 |
| 4.1.1. | CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Leishmania infantum chagasi</i> | 50 |
| 4.1.2. | BIOCOMPATIBILIDADE DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA <i>In vivo</i> | 51 |
| 4.1.3. | IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA AO ADJUVANTE CAF09 | 53 |
| 4.2. | PARTE II - AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOGÊNICAS E PROTETORAS DA VACINA LaAg ASSOCIADA AO ADJUVANTE MPL+CAF01..... | 57 |
| 4.2.1. | AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DA VACINA | 58 |
| 4.2.2. | IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA AO ADJUVANTE MPL+CAF01. | 60 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 67 |
| 6. | CONCLUSÃO | 76 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 78 |

1. INTRODUÇÃO

1.1.LEISHMANIOSES E ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose é umas das doenças de maior incidência transmitida por vetores (que podem acometer os seres humanos e outros vertebrados). É causada por várias espécies de protozoários unicelulares digenético do gênero *Leishmania*, o qual pertence à ordem Kinetoplastida, e família *Trypanosomatidae*, (ALVAR et al., 2012). A doença é Transmitida por meio da picada de dípteros conhecidos como flebotomíneos, que têm mais de 500 espécies, das quais só 30 transmitem a doença.

A classificação taxonômica dessas espécies foi determinada, inicialmente, com base nos critérios ecobiológicos do parasito (manifestação clinica, propriedades antigênicas, distribuição geográfica espécie de vetor, tropismo). Esses critérios foram utilizados por Ross, em 1903, mas na atualidade se agregou o critério molecular e bioquímico para classificação, baseando-se na variedade polimórfica do material gênico nuclear (DNA) e do cinetoplasto (k-DNA), assim como cariotipagem cromossomal, informações filogenéticas de alguns genes e proteínas antigênicas, utilizadas como marcadores para classificação taxonômica divergente de todos os membros do gênero *Leishmania*, importante nos estudos epidemiológicos. (GRIMALDI; TESH, 1993).

A morfologia dos parasitos se divide em uma forma amastigota, localizada no interior das células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, de estrutura oval, morfologia presente no interior das células fagocitárias do hospedeiro vertebrado e apresentando um núcleo pronunciado e uma membrana celular com a peculiar característica de ter um surco e conformação equidistante na secção anterior de estrutura, formando a bolsa na qual se ubíqua o flagelo. Caracteriza-se também por apresentar organelas, tais como aparelho Golgi, reticulo endoplasmático, ribossomos e vacúolos, além de estruturas microtubulares no citoplasma que exibem um formato de nove (BEATTIE; KAYE, 2011; CANTON; KIMA, 2012).

Os parasitos também apresentam uma forma flagelar fusiforme conhecidas como promastigota, localizadas no trato digestivo no hospedeiro invertebrado, elas possuem flagelo de maneira livre e alongado, o qual facilita sua locomoção, um núcleo oval na parte anterior. (LIEHL; ZUZARTE-LUIS; MOTA, 2015; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A

reprodução dessa espécie acontece por meio de divisão binária, na qual variações no núcleo e no cinetoplasto, que se encontram densos e, por isso, são divididos em dois de maneira longitudinal pela região anterior, originando dois parasitas. Isso ocorre da mesma forma para as amastigotas.

O flebotomo se infecta durante o repasto sanguíneo ao ingerir macrófagos parasitados com o protozoário, seguido do rompimento das células no trato digestivo do díptero. Com isso, ocorre uma pronta transformação das amastigotas para a forma promastigota, as quais permanecem dentro de uma membrana peritrófica digestiva. O protozoário se multiplica nas paredes do estômago, migrando para faringe e transformando-se em uma forma infetante denominada promastigota metacíclica, de movimento rápido e alta virulência. (LIÉVIN-LE MOAL; LOISEAU, 2016; BORGHI et al., 2017).

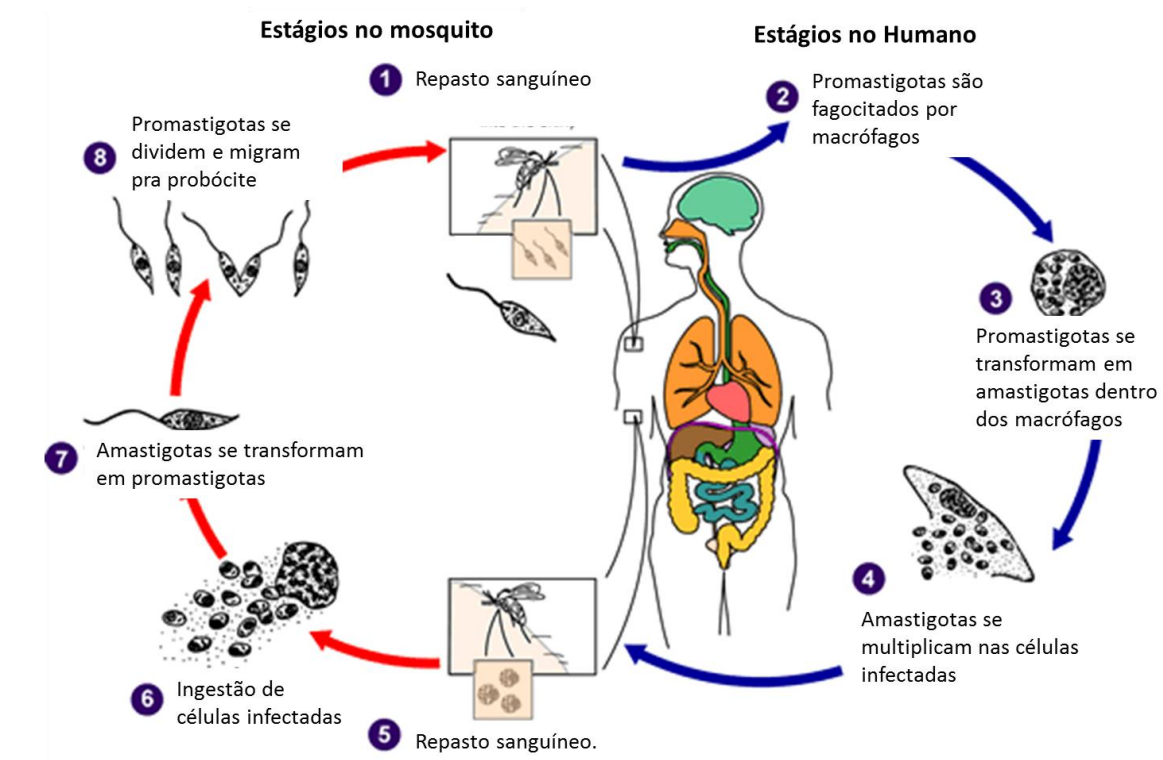


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania sp.* Global Health – Division of Parasitic Diseases. 2013

2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As leishmanioses podem se apresentar em diferentes formas clínicas, dependendo das características imunológicas do hospedeiro vertebrado, bem como da espécie da parasita. As manifestações clínicas encontram-se classificadas como leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose visceral (LV). A LTA é caracterizada por lesões manifestadas predominantemente nos tegumentos cutâneos e mucosos o que se subdivide em quatro diferentes formas (cutânea, cutânea difusa, muco-cutâneas e disseminada) que serão descritas a seguir. A outra manifestação é observada na leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar neotropical, é uma doença crônica de alta letalidade caso não haja o tratamento adequado. (CECÍLIO et al., 2014).

2.1.1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC)

Caracterizada por formação de lesões na derme e nódulos repletos de parasitas. As lesões apresentam forma de “cratera de vulcão”, repletas de parasita na borda, grande infiltrado inflamatório e centro necrótico. Existem distintas espécies de *Leishmania* sp causadoras dessa manifestação, as quais são pertencentes aos subgêneros *Vianna* e *Leishmania* e encontrados nas Américas Central do Sul.

1.2.2. LEISHMANIOSES MUCOCUTÂNEA (LCM)

Causada por *L. braziliensis* no Brasil, é caracterizada por danos na membrana mucosa, conhecidos como lesões muco-cutâneas ou cutaneomucosa. Esta forma leva a desfiguração nasal (nariz, faringe, laringe e boca) com ulcerações e grande infiltrado inflamatório. Pacientes com esta forma da doença apresentam dificuldades respiratórias e alimentares. (CECÍLIO et al., 2014; DAVID; CRAFT, 2009).

1.2.3. LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)

Trata-se de uma manifestação clínica tegumentar americana gerado por *L. mexicana* no México, *L. pifanoi*, na Venezuela e *L. amazonensis* no Brasil. Seu nome se deve ao fato de que se produzem numerosas ulcerações em toda a pele com foco principal nas extremidades, acompanhadas de erupções causadas pela metástase da parasita em forma amastigota. Sua disseminação ocorre pelo transporte por macrófagos no sangue ou via linfática, apresentando um curso crônico de maneira progressiva, a qual não apresenta resposta positiva aos tratamentos (CECÍLIO *et al.*, 2014).

1.2.4 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica com letalidade de 90% caso não seja tratada. Pode afetar indivíduos de todas as idades, causando danos a órgãos internos importantes como baço, fígado e medula óssea.. Essa doença é ocasionada por parasitas da espécie *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi*, (CECÍLIO *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas destacam-se pela febre prolongada, quadros de anemia, perda de apetite e peso, tosse, diarreia, linfadenopatia (aumento dos gânglios linfáticos) e aumento abdominal ou distensão com esplenomegalia e hepatomegalia (aumento da massa dos órgãos do Baço e do Fígado). A esplenomegalia e hepatomegalia se expressam mais na fase crônica da doença. Histologicamente esses órgãos apresentam colorações fora do normal e presença de áreas de infarto ou quadros de inflamação, sendo que as células fagocitárias e plasmáticas teciduais denotam uma hiperplasia e hipertrofia com a presença da parasita em sua forma amastigota. Além de isso, evidencia-se uma diminuição das células T e um aumento de disprotenemia, principalmente níveis baixos de albumina, ocasionando também a formação de edemas dos membros inferiores do indivíduo com uma perda de funções normais nos órgãos e danos imunológicos, no caso do baço. (VARMA; NASEEM, 2010). Ainda durante a infecção pode acontecer uma eritopoieses e granulopoiese e, devido a isso, uma alteração do tecido hemocitopoético, no qual os níveis de eritrócitos são muito baixos nos indivíduos, expressando anemia normocítica (número baixo de Eritrócitos) e normocrômica (níveis baixos de Ferro). Os

pacientes também apresentam uma redução da concentração das plaquetas, conhecida como trombocitopenia. Isso favorece a formação de hemorragias nas membranas das mucosas e aumentando resgo das infecções, as quais podem causar a morte. (WOODRUFF et al., 1972; AL-JURAYYAN et al., 1995; COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; VARMA; NASEEM, 2010; BATES; EKEM, 2015).

A infecção de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) pelo parasita favorece uma maior manifestação clínica da doença em órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Mas sua aparição se pode ser observada em outros órgãos, causando alterações como danos renais, pulmonares e digestivos. Além disso, são observados a formação de imunocomplexos circulantes, ocasionando um desenvolvimento da doença abrupta e perigosa para hospedeiro (WOODRUFF et al., 1972; AL-JURAYYAN et al., 1995; COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; VARMA; NASEEM, 2010; BATES; EKEM, 2015).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses têm distribuição mundial, abarcando 98 países em todos os continentes. Atualmente coloca mais de 350 milhões de pessoas no grupo de risco. (MURRAY et al., 2005; ALVAR et al., 2012; PAHO/WHO, 2017) Sabemos que a infecção com *Leishmania sp* não só ocorre nos seres humanos, podendo também afetar animais domésticos e selvagens, demonstrando alta complexidade na transmissão e ciclo de vida (REMME et al., 2002).

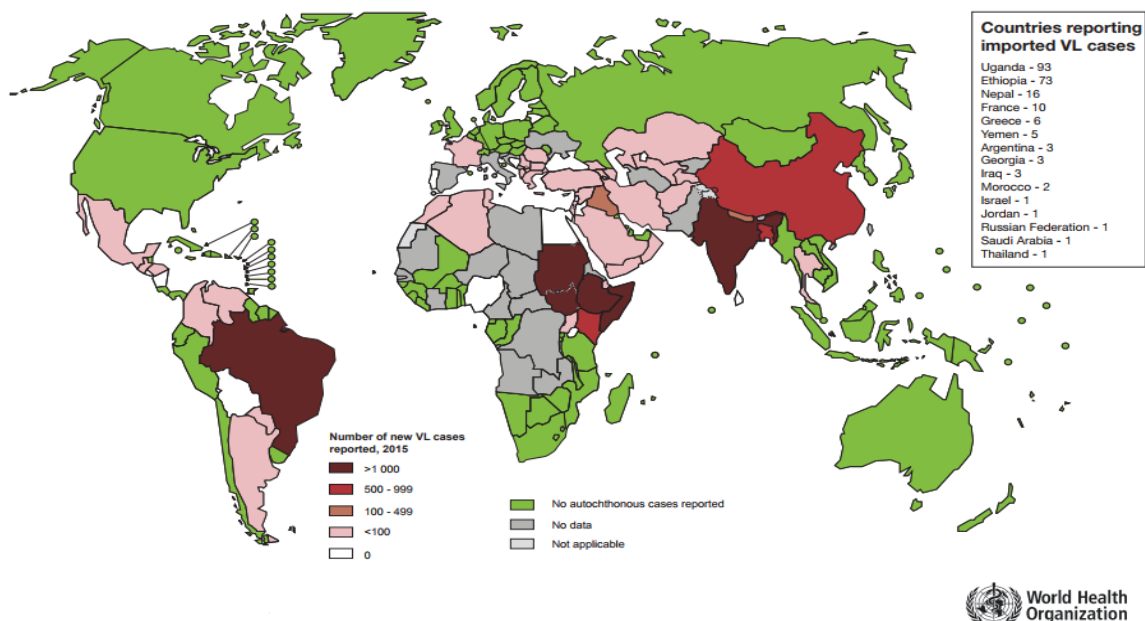
A preguiça (*Choloepus spp* e *Bradypus spp*) e cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) são os principais reservatórios não humanos de *Leishmania sp* (ASHFORD, 1996). Os canídeos são os principais reservatórios na Ásia, no norte da África e na América do Sul. A leishmaniose visceral apresenta dois tipos básicos de ciclos epidemiológicos, que dependem do tipo de reservatório vertebrado, podendo ser classificada como uma zoonose ou antroponose. A leishmaniose visceral antroponótica humana associa-se usualmente à *L. donovani* no Velho Mundo, onde se destaca a Índia. A leishmaniose visceral zoonótica, passada de cães para humanos está associada à espécie *L. infantum chagasi* na Ásia, em países mediterrâneos e no

Brasil, onde se destacam as cidades de Belo Horizonte e Fortaleza. (MAURICIO et al., 1999; MAURÍCIO, IL., STOTHARD, JR., MILES, 2000).

A leishmaniose visceral, alvo do nosso trabalho, descreve-se como a doença causadora da morte de 60.000 pessoas em todo o mundo anualmente. É causada pelas espécies *L. infantum chagasi*, e *L. donovani*. (GONTIJO, CÉLIA MARIA FERREIRA; MELO, 2004).

Países como Índia, Bangladesh, Sudão, Nepal, Brasil e Etiópia destacam-se com mais de 96,6% dos casos globais (PAHO/WHO, 2017). No Brasil podemos citar algumas cidades como epidêmicas para a doença, onde se destacam Belo Horizonte, Natal, Campo Grande (PROFETA DA LUZ et al., 2001), São Luís (NASCIMENTO et al., 1996; CALDAS et al., 2001), Teresina (WERNECK et al., 2003) e Salvador (CUNHA et al., 1995). O nordeste brasileiro apresenta maior número de casos de LV do país (92%), acompanhado da região sudeste (4%), norte (3%) e centro-oeste (1%) (BRASIL; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015



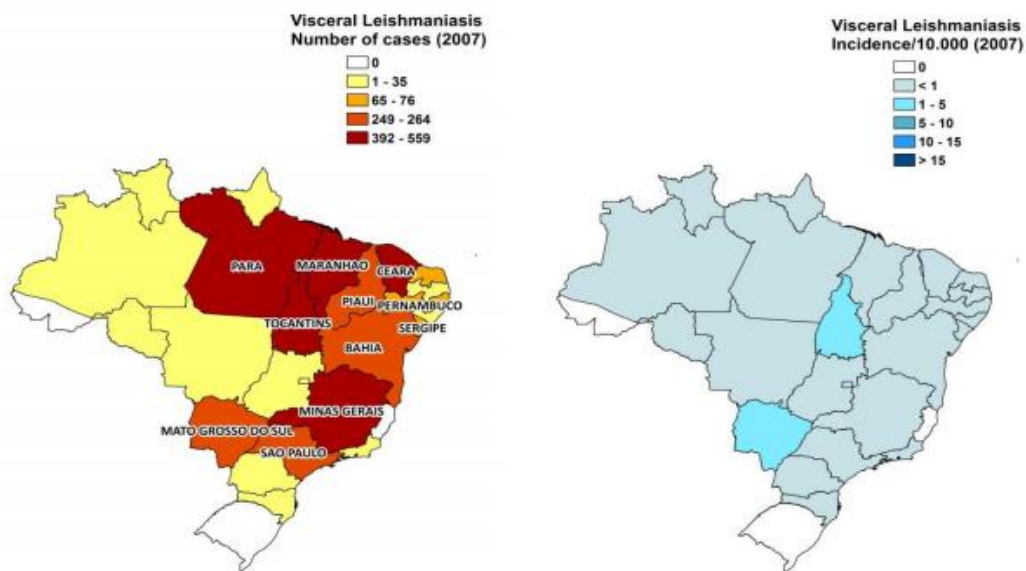


Figura 2. Distribuição mundial da Leishmanioses Visceral (2015) e casos clínicos no Brasil (2007).
PAHO:2016

1.4. RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NAS LEISHMANIOSES

A resposta imunológica compreende uma complexa rede de elementos responsáveis por promover a homeostase do organismo. Para que se tenha uma resposta imunológica adequada e protetora contra *Leishmania*, é necessário que o hospedeiro possua um repertório de células, que apresentam um papel crucial na coordenação dessa resposta de defesa do organismo.

O processo inflamatório inicia-se logo após a picada do inseto vetor flebotomíneo, quando são inoculadas as formas infectantes da parasita juntamente com a saliva do inseto que apresentam características vasodilatadoras, anticoagulantes e efeitos imunomoduladores

Esses imunomoduladores estimulam a secreção de quimosinas como MCP-1 e CXCL1, capazes de promover a quimiotaxia de macrófagos, monócitos e neutrófilos, que posteriormente

alvos de infecção pelo parasita. (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). Células infectadas podem migrar por meio das vias linfáticas inicialmente para a região dos linfonodos e, posteriormente para áreas viscerais do indivíduo como tecido esplênico, hepático, pulmonar e hematogênicas (GANNAVARAM et al., 2016).

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem capacidade de evadir a resposta imunológica do hospedeiro, facilitando seu estabelecimento, sobrevida capacidade de promover infecções crônicas. Um dos importantes mecanismos de escape das formas flageladas da *Leishmania* é a capacidade de expressar em suas superfícies estruturas moleculares como o complexo lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula durante o processo infeccioso sofrem modificações em sua estrutura impedindo a ativação do complemento e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (MCCONVILLE et al., 1992). Além do LPG, proteínas como as metaloproteinases, proteofosfoglicanos (PPG) e a gp63 participam do processo de escape do sistema imune (HANDMAN; BULLEN, 2002; SACKS; SHER, 2002).

Outro mecanismo relaciona-se às alterações das proteínas do complemento, devido à proteína gp63. Isso acontece porque esta proteína cliva a C3b em uma forma inativa, causando uma ligação incompleta do complemento no protozoário e facilitando a infecção nas células SMF. Também podem interagir com os receptores celulares ou receptores de reconhecimento de padrões (PRR), já que podem ser reconhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (BRITTINGHAM et al., 1995; HANDMAN; BULLEN, 2002; TEIXEIRA et al., 2006; SPÄTH; CLOS, 2016).

Além das moléculas, células da imunidade inata e adaptativa possuem papel importante no controle da infecção ou na susceptibilidade do hospedeiro ao parasita. Essas células são:

1.4.1. Neutrófilos

São células polimorfonucleares (PMNs) e consideradas como as primeiras células do sistema imune a chegarem ao local da infecção. Sua função de fagocitose tem um papel importante no controle inicial do parasita, no entanto esta célula favorecer a capacidade do

parasita de sobreviver uma vez que podem ser infectadas, ou mesmo por impedirem a indução da oxidase fagocítica quando são ingeridas por outras células fagocíticas. Essas células também são importante fonte de quimosinas e IL-8, que atuam na atração de outras células. (LAUFS et al., 2002).

1.4.2. Macrófagos e células dendríticas

Participam na RI contra a *Leishmania*, onde atuam na apresentação de antígenos. Ambas as células migram através da linfa para os linfonodos regionais ou do sangue para o baço, para realizar a função de apresentação. Os macrófagos ainda possuem a função de eliminarem os parasitas, que pode ser prejudicada pela LPG e gp63 mediante a inibição da proteína quinase C (PKC). Isso contribui a inibição da ação microbicida e da produção de intermediários reativos do oxigênio (GIORGIONE; TURCO; EPAND, 1996).

A *Leishmania* possui capacidade de modular modula os mecanismos de fagocitose e aumentar o tempo de vida do neutrófilo através da alteração de vias de apoptose, como da caspase-3 ou pela fosforilação das quinases ERK1/2, favorecendo o estabelecimento e expansão da parasita. (SARKAR et al., 2013). Infecções por *L.infantum chagasi* inibem a produção de moléculas proinflamatórias e têm efeitos modulatórios negativos em macrófagos e monócitos humanos (DE ALMEIDA et al., 2003). Já *L. donovani*, modula negativamente a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, prejudicando a apresentação de antígeno (REINER; SCHULTZ; MALEMUD, 1988).

Em modelos murinos de infecção por *L. major*, células T helper de tipo 1 (T_h1) são as principais fontes secretoras de citocinas mediadoras da proteção como interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ). Por outro lado, a susceptibilidade está juntamente associada a expansão de células T helper de tipo 2 (T_h2) secretoras de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5) (SCOTT et al., 1988; RICO et al., 1999; MOHAMMADI et al., 2006; KAUR; THAKUR; KAUR, 2013). Diferentemente deste modelo clássico de infecção cutânea murina utilizando *L. major*, diferenças no grau de resistência ou susceptibilidade a LV não estão associadas à expansão preferencial de células T das subpopulações T_h1 ou T_h2, respectivamente. Na prática,

tem-se ambas as respostas ocorrendo simultaneamente, e é principalmente a prevalência da produção de IFN- γ e IL-4 que determina a resistência à infecção, enquanto a produção de IL-10 e TGF- β está correlacionada à susceptibilidade (NAGILL et al., 2009). Em pacientes com LV causada por *L. donovani*, a dosagem de citocinas em sobrenadantes de CMSP ou de células estimuladas *in vitro* com Antígenos (ag) do parasito demonstrou um misto de respostas T_h1/T_h2. Além disso, altos níveis de IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 são detectados em pacientes com LV ativa ou mesmo em indivíduos curados em resposta ao Ag (HAILU et al., 2005). Outras citocinas T_h2-relacionadas, como IL-13 (BABALOO; KAYE; ESLAMI, 2001) e TGF- β (GANNTT et al., 2003), são detectadas durante a LV, embora suas funções biológicas na modulação da resposta imune leishmania-específica ainda são desconhecidas desconhecidos.

1.5. TRATAMENTOS

Os antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺) são usados no tratamento das leishmanioses há mais de 80 anos. Sua ação afetar a atividade da via oxidativa de ácidos graxos das formas amastigotas, levando o parasita à morte. Além disso, os antimoniais podem atuar na estimulação do estresse oxidativo nos macrófagos e favorecer o controle do parasita intracelular. (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). O tratamento quimioterápico está longe de ser satisfatório. Eles são extremamente tóxicos, há necessidade de internação do paciente o que eleva o preço do tratamento, além de serem associados ao aparecimento de cepas do parasita resistentes ao tratamento. Além disso, efeitos como dor no peito e abdominal, vômito, perda de apetite, diarreia e náuseas, complicações cardíacas, renais e hepáticas. São relatadas em pacientes (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007; BAIOTTO et al., 2009).

Além dos antimoniais pentavalentes, drogas mais recentes como anfotericina B e sua forma lipossomal, pentamidinas, desoxicolato de sódio, miltefosina e outros, vêm sendo utilizados em situações especiais onde a administração dos antimoniais não é possível. Entretanto, problemas como toxicidade e alto custo também geram limitações de uso. (SOTO et al., 2001, 2004; SOTO; SOTO, 2006; RAHMAN, 2007). Neste contexto, a necessidade de medidas profiláticas se torna fundamental.

1.6. VACINAS NA LEISHMANIOSE

A vacinação é uma das maiores e mais importantes descobertas na história da medicina e é o método profilático mais bem elaborado aplicável na erradicação e prevenção de doenças infecciosas causadas por diferentes agentes patogênicos. Atualmente existem diferentes tipos de formulações, utilizadas comercialmente ou experimentalmente contra as diferentes formas e espécies do parasito. Elas são classificadas de acordo com suas características antigênicas e descritas com mais detalhes a seguir.

1.6.1. Vacinas de primeira geração

Este grupo de vacinas é composto por antígenos atenuados ou antígenos brutos não caracterizados. O estímulo gerado pela vacina de antígenos brutos origina uma resposta imunológica adaptativa que mimetiza uma resposta naturalmente produzida pelo organismo durante uma infecção (SRIVASTAVA et al., 2016). Os parasitas utilizados podem ser atenuados através da sensibilização térmica e física ou mediante mutações gênicas (radiação UV e alterações químicas). O processo de atenuação afeta a capacidade do patógeno de evitar a resposta imunológica, mas ainda permanecendo o potencial de restauração da virulência. (FIUZA et al., 2015).

A Leishvacin® é o exemplo mais importante deste tipo de vacina contra a leishmaniose cutânea. O estímulo gerado a partir da vacinação levou a montagem de uma resposta parcialmente protetora (MAYRINK et al., 1999), com o aumento nos níveis de IFN- γ em camundongos BALB/c e macacos, (DE LUCA et al., 1999). Entretanto, com os estudos clínicos em humanos a vacina não apresentou eficácia tendo sua produção descontinuada. (VÉLEZ et al., 2009).

Venezuela, Sudão e Irã também utilizaram vacinas atenuadas na imunoterapia e imunoquimioterapia contra leishmaniose cutânea e visceral. Parasitas de *L. major* mortos por alta pressão e temperatura (autoclave) foram utilizados em associação com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). No entanto, os resultados obtidos evidenciam a baixa estimulação imunológica e

consequentemente, uma resposta imunológica ineficaz contra o patógeno. (SHARIFI et al., 1998; MOMENI et al., 1999; KHALIL et al., 2000; SATTI et al., 2001).

A imunização por vias de mucosas com Ag de *L. amazonensis* (LaAg), equivalente a Leishvacin® e também utilizado neste trabalho é outro exemplo do emprego de vacinas de 1ª geração administradas por uma via alternativa às imunizações parenterais, conforme demonstrado por nosso grupo (PINTO; DE MELLO CORTEZIA; ROSSI-BERGMANN, 2003; DE MATOS GUEDES et al., 2007, 2010, 2014) e visceral (LEAL et al., 2015). Nestes trabalhos são demonstrados que a imunização oral ou nasal com LaAg confere proteção a camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, respectivamente, acompanhado do aumento na produção de IFN- γ e diminuição de IL-10 (PINTO; DE MELLO CORTEZIA; ROSSI-BERGMANN, 2003; LEAL et al., 2015).

Além disso, formulações utilizando antígenos brutos com agonistas de receptores tipo toll TLR 7 e TLR 8 tem demonstrado significava proteção contra *L. major*, com diminuições da lesão e carga parasitária e aumento na produção de IFN- γ (ZHANG et al., 2009).

1.6.2. Vacinas de segunda geração:

Em alternativa a ineficácia e ineficiência da resposta gerada por vacinas de primeira geração, vacinas de segunda tem sido exploradas, demonstrando resultados promissores. Elas são caracterizadas como vacinas vivas geneticamente modificadas ou subunidades compostas por frações e sub-frações isoladas ou purificadas do patógeno. As vacinas vivas incluem promastigotas causantes de uma infecção abortiva, como um clone de *L. major* do qual foi removido o gene para a proteína diidrofolato redutase/timidilato sintetase (CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991); de LPG, ou ainda transportadores de GDP (GAUR et al., 2009). Entre as vacinas com subunidades definidas, destacam-se as glicoproteínas gp63 de *L. major* (BADIEE et al., 2008); a proteína A2 (FERNANDES et al., 2008); KMP11 de *L. donovani* (CARRILLO et al., 2008); proteases e peptidases (FERREIRA et al., 2008); a proteína citoplasmática LACK de *L. infantum chagasi* (JENSEN; SERCARZ; GABAGLIA, 2009); enzimas relacionadas a síntese de lipídeos como a esterol 24-C-methyltransferase de *L. infantum* (GOTO et al., 2009); histonas

nucleossomais de *L. donovani* (CARRIÓN; FOLGUEIRA; ALONSO, 2008) proteína HASPB1 de *L. infantum chagasi* (MORENO et al., 2007); proteína 1 de *L. donovani* induzida por estresse (BADIEE et al., 2009a) e o FML (ligante de fucose e manose) de *L. donovani*, antígeno base na composição da vacina Leishmune®

1.6.3. Vacinas de terceira geração:

Nas últimas décadas, estudos da constituição do genôma forneceram base para este tipo de inovação, onde forneceram a base para decodificar e entender as diferentes proteínas que favorecem a resistência do patógeno durante. Com base nesse conhecimento, uma nova geração de vacinas parece ser promissora no combate contra leishmaniose.

As vacinas de terceira geração são também conhecidas como vacinas gênicas e recebem esse nome devido ao uso de genes em sua composição. Além disso, o uso de bactérias e vírus recombinantes capazes de codificar antígenos do parasita também são inseridos desta classificação. (MCMAHON-PRATT et al., 1993; GURUNATHAN; KLINMAN; SEDER, 2000). Estudos demonstraram que a vacina plasmidial intramuscular que transporta o gene codificante para a proteína gp63-DNA protege camundongos contra *L. mexicana* (ALI et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que vacinas com KMP11-DNA (BHAUMIK et al., 2009) ou o plasmídeo que codificam para a porção N-terminal de 27 proteoglicanas de *L. donovani* induzem proteção no combate ao parasita. (SAMANT et al., 2009). Imunizações diretas com plasmídeos, ou utilizando-se de vetores virais codificando a proteína A2, mostraram significativa proteção contra infecção por *L. donovani*, associada à produção de IFN- γ , resposta mista T_h1/T_h2, forte resposta humoral e reduzida internalização de amastigotas por macrófagos (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001), bem como garantiram proteção quando utilizada contra infecção por *L. amazonensis* (FERRAZ COELHO et al., 2003). Vacinas de DNA codificando as proteínas gp63 e Cisteína Proteinase B (CPB) de *L. mexicana* e gp46 de *L. amazonensis* protegem parcialmente contra infecção por *L. mexicana* (DUMONTEIL et al., 2003). A utilização de vetores virais ou a confecção de misturas de plasmídeos tem sido utilizados como alternativa para a indução de proteção contra *Leshmania*. A imunização intramuscular com uma mistura de plasmídeos (CPb, GP46 e GP63) induziu proteção parcial contra *L. mexicana* em camundongos

BALB/c (DUMONTEIL et al., 2003). A mistura de plasmídeos contendo os genes LmST11, LACK e TSA por via intradérmica, intramuscular e subcutânea conferiu significativa proteção a camundongos C57BL6 desafiados com *L. major* (MÉNDEZ et al., 2002).

1.7. VACINAÇÃO VIA MUCOSA NASAL

A vacinação via mucosa favorece a indução da resposta efetora contra diferentes doenças, favorecendo instalação de uma resposta local e sistêmica com maior rapidez (PABST, 2015). A via da mucosas tem se tornado um meio atraente de vacinação por ser um fácil acesso, pela alta vascularização e numerosas microvilosidades do epitélio que geram uma grande superfície de absorção dos Ag administrados (ILLUM et al., 2001). A resposta é dirigida através do tecido linfoide associado a mucosa (*Mucosal Associated Lymphoid Tissue* – MALT), onde se observa a presença de componentes do tecido linfoide folicular e acúmulo de linfócitos B e T, além de conter uma intensa rede de vênulas endoteliais (*High Endothelial Venulas* - HEV) responsável pelo suprimento sanguíneo local. (MAKALA; SUZUKI; NAGASAWA, 2002; NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006; BRANDTZAEG et al., 2008).

O sistema imune de mucosa se subdivide em distintos grupos de tecidos mucosos. São eles: Tecido Linfoide Associado à Mucosa Nasal (*Nasal associated lymphoid tissue* - NALT), Tecido Linfoide Associado ao Intestino (*Gut-associated lymphoid tissue* - GALT), tecido linfoide associado aos brônquios (*Bronchus-associated lymphoid tissue* -BALT), e os tecidos pertencentes à região retal e vaginal (*Genital-associated lymphoid tissue* - GENALT). As regiões associadas ao tecido linfoide são altamente vascularizadas para facilitar o transporte do exsudado celular e, assim, garantir uma resposta local e sistêmica específica. A resposta específica gerada a partir de um estímulo favorecem a diferenciação das células T naive em células T efetoras e produção de imunoglobulinas do tipo A (IgA) (YUKI; KIYONO, 2003; MESTECKY et al., 2009; WANG et al., 2014).

O uso de vacinas nasais para a prevenção vem sendo utilizado, muitas vezes sem a presença de adjuvantes. Vantagens como a facilidade de aceso, doses menores de antígeno e

capacidade de gerar umas respostas locais e sistemáticas favorecem seu uso. Além disso, não requerem injeções dolorosas ou profissionais de saúde para seu uso. (YUKI; KIYONO, 2003; KIYONO; FUKUYAMA, 2004).

A última década os avanços no desenvolvimento de vacinas nasais permitiram seu uso na promoção de respostas imunes contra bactérias vírus e protozoários (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). A vacinação oral e nasal com antígenos brutos de promastigotas de *L. amazonensis* (LaAg) e sem adição de adjuvantes protegeu parcialmente camundongos BALB/c e C57Bl/6 contra a infecção com *L. amazonensis* (PINTO; DE MELLO CORTEZIA; ROSSI-BERGMANN, 2003). Além disso, a vacinação nasal com um plasmídeo portando o gene p36 LACK de *L. infantum chagasi* foi capaz de conferir proteção parcial a camundongos BALB/c contra infecção cutânea por *L. amazonensis* (PINTO et al., 2004) e visceral por *L. infantum chagasi* (GOMES et al., 2007), reforçando a viabilidade do uso dessas vias na vacinação contra a leishmaniose. Pelo fato de serem substâncias na qual, proporcionam um aumento da imunogenicidade quando administradas conjuntamente com antígenos de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, (DE LUCA et al., 1999; PINHEIRO et al., 2007; DE MATOS GUEDES et al., 2014).

1.7.1. Antígeno total de *Leishmania amazonensis* (LaAg).

O uso dos antígenos totais *Leishmania amazonensis* (LaAg) foi implementado com a Leishvacin®, demonstrando que o uso dessas moléculas pode estimular e induzir a produção de IFN- γ em camundongos BALB/c e macacos. (DE LUCA et al., 1999). No entanto, seu uso clínico obteve uma resposta ineficaz contra Leishmanioses Cutânea Americana. (VÉLEZ et al., 2005). Ele foi amplamente utilizado em modelos experimentais e também por sua utilização intranasal, conforme abordado anteriormente.

1.8. ADJUVANTES

A imunidade adaptativa nas vacinas pode ser favorecida mediante a presença de um imune estimulador (adjuvante). Eles são componentes capazes de estimular de maneira exógena a imunidade inata ou adaptativa, ajudando na imunidade protetora do hospedeiro. (KOYAMA et al., 2010). Muitos adjuvantes podem proporcionar o direcionamento de distintas respostas imunes patógeno-específicas (LAHIRI; DAS; CHAKRAVORTTY, 2008).

Os adjuvantes podem ser classificados em dois distintos grupos, condicionados a sua variabilidade de substâncias, sejam biocomponentes derivados de organismos vivos ou componentes orgânicos, tais como óleos ou de caráter químico (inorgânico) (COFFMAN; SHER; SEDER, 2010; REED; ORR; FOX, 2013). Eles podem estimular os receptores inatos, tais como Toll-like receptors (TLRs), Nod-like receptors (NLRs), AIM2-like receptors (ALRs), CGAS/STING e RIG-I-like receptors (RLRs), provocando a produção de citosinas, quimosinas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Dentre os diferentes receptores, o TLR2 tem tido um importante destaque em estudos de adjuvantes para vacinas bacterianas, resultando na super expressão de citosinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-12 e TNF- α (CHENG et al., 2009, 2011, 2014).

Na leishmaniose experimental, o emprego de adjuvantes tem demonstrado ser uma promissora ferramenta na potencialização do efeito protetor contra a infecção por espécies causadoras da leishmaniose visceral e cutânea. Assim, imunizações com antígenos associados à citocinas, principalmente IL-12 (BHAUMIK; NASKAR; DE, 2009) e ligantes de TLR (ZHANG et al., 2009) tem sido descritos como indutores de imunidade protetora contra o desafio por *L. major*. O emprego de células dendríticas pulsadas com antígenos do parasito (CARRIÓN; FOLGUEIRA; ALONSO, 2009) ou mesmo a utilização de antígenos associado a microorganismos atenuados ou vivos como *Mycobacterium vaccae* (SHIRIAN et al., 2012) tem demonstrado serem eficazes na indução de respostas imunes protetoras contra *L. infantum chagasi* e *L. major*, respectivamente.

Uma grande diversidade de Ags vem sendo testados associados a membranas lipídicas e lipossomos catiônicos, incluindo proteínas purificadas de *Leishmania* (BHOWMICK; RAVINDRAN; ALI, 2008; BADIEE et al., 2009a, 2009b); plasmídeos codificando proteínas

imunogênicas ou DNA CpG adjuvantes (MAZUMDER et al., 2007; BADIEE et al., 2009b) ou mesmo antígenos totais do parasita. (SANTOS et al., 2006, 2009; MAZUMDER; MAJI; ALI, 2011) com significantes resultados de proteção no desafio contra as leishmanioses visceral e cutânea. No entanto o uso de lipossomos é limitado pelo grande preço, dificuldade de armazenamento (necessidade da manutenção da “cadeia fria”) o que inviabiliza sua utilização em locais remotos e de difícil acesso, bem como sua grande instabilidade.

Neste estudo, determinou-se a avaliação de dois distintos adjuvantes (Lipídeo A Monofosfórico (MPL) e o Adjuvante Catiônico (CAF) descritos detalhadamente a seguir.

1.8.1. Lipídeo A Monofosfórico (MPL)

É um componente derivado do lipopolisacarídeo (LPS) com uma estrutura composta por dissacarídeos com cadeias de ácidos graxos, extraído da *Salmonella minnesota* Re595 (BALDRICK et al., 2002). O componente MPL mantém sua atividade agonista de Toll-like receptor 4 (TLR 4) do LPS, sendo 100 vezes menos tóxico que o LPS.

Estudos utilizando a molécula demonstram grande capacidade imunoestimulatória Além disso, já foi administrado em mais de 30.000 indivíduos, entre estudos de vacinas para câncer e outros agentes, bem como em modelos experimentais, onde demonstrou significativa capacidade de ativação de células DCs e linfócitos. (BLANCO et al., 2014; HABIBI et al., 2015; KOLANOWSKI et al., 2016; MARGARONI et al., 2017).

O MPL estimula a produção de citocinas como IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β , bem como o aumento da atividade de NO, da habilidade fagocítica mediada por macrófagos e da proliferação celular (REED; ORR; FOX, 2013). Além disso, essa molécula estimula tanto uma resposta imune humoral como celular de tipo T_h1, (STOUTE et al., 1997; SAFARY et al., 1998; THOMPSON et al., 1999).

Estudos recentes utilizando a vacinação subcutânea com MPL em modelos de com infecção por *Leishmania* demonstraram resultados promissores no estímulo de células dendríticas e linfócitos, além da indução da produção de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-12, IL-10, IL-2, TNF- α (MARGARONI et al., 2016, 2017). O mesmo componente foi testado em associação com o

antígeno Leish-111f (Leish-111f+MPL-SE), expressando eficácia e ação imunogênica em humanos, camundongos e em cães, tendo como resposta em cães e em camundongos uma diminuição da carga parasitaria e expressão de IFN- γ , IL-2, IL-10, TNF- α e IgG (COLER et al., 2007; TRIGO et al., 2010; MUTISO et al., 2013).

1.8.2. Lipossomas de carga positiva (CAF).

O uso de lipossomas na vacinação para favorecer respostas imunológicas são reportados desde 1974 (ALLISON; GREGORIADIS, 1974; GREGORIADIS; ALLISON, 1974). Foram utilizados lipossoma em associação com exotoxina diftérica, a qual demonstrou de maneira efetiva a entrega de antígenos às células APC, bem como do estímulo dos PRRs. Adjuvante baseado em lipossomas de carga positiva, em inglês Cationic Adjuvant Formulations (CAF), têm demonstrado efetiva indução de células T específicas (SCHMIDT et al., 2016). O dimetil dioctadecil amônio (DDA) é um composto quaternário de amônio, formado por um lipídeo anfifílico sintético e 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 mediada por células (DAVIDSEN et al., 2005).

Apesar dessa efetividade, foi observado que os lipossomas de DDA são fisicamente instáveis (SNIPPEA et al., 1982; KRAAIJEVELD et al., 1983). Devido a isso, o trealose 6,6'-dibeenato (TDB), um glicolípido 6,6'-di-éster de α , α' -trealose com duas cadeias longas de ácido bênio, foram utilizados para solucionar o problema da estabilidade do DDA, sendo incorporado às camadas duplas de lipossoma do DDA, formando CAF 01 de primeira geração, o qual os estudos descrevem como promissor contra doenças infecciosas com uma resposta T_{H1} (DAVIDSEN et al., 2005; CHRISTENSEN et al., 2007, 2009). Não em tanto, ao agregar o composto (MMG) -1, em inglês “*monomycoloyl glycerol*”, em combinação com o componente antagonico de TLR 3 o poli (I:C), em inglês “*Polyinosinic-polycytidylic acid*”, são os componentes na formulação e diferença tanto estrutural, índice de dispersão, tamanho, potencial de carga e função entre os outros adjuvantes dessa mesma linha conhecidos como CAF05 e CAF09, na qual, este ultimo têm gerado ótimas respostas imunes anti tuberculose, influenzas

pandêmicas e uma atividade alta de Células T CD8⁺ assim como, a expressão de IFN- γ , α , β e TNF- α provenientes das células, as quais são citotóxicas utilizadas em casos pré-clínicos contra Câncer e HIV (KORS HOLM et al., 2014).

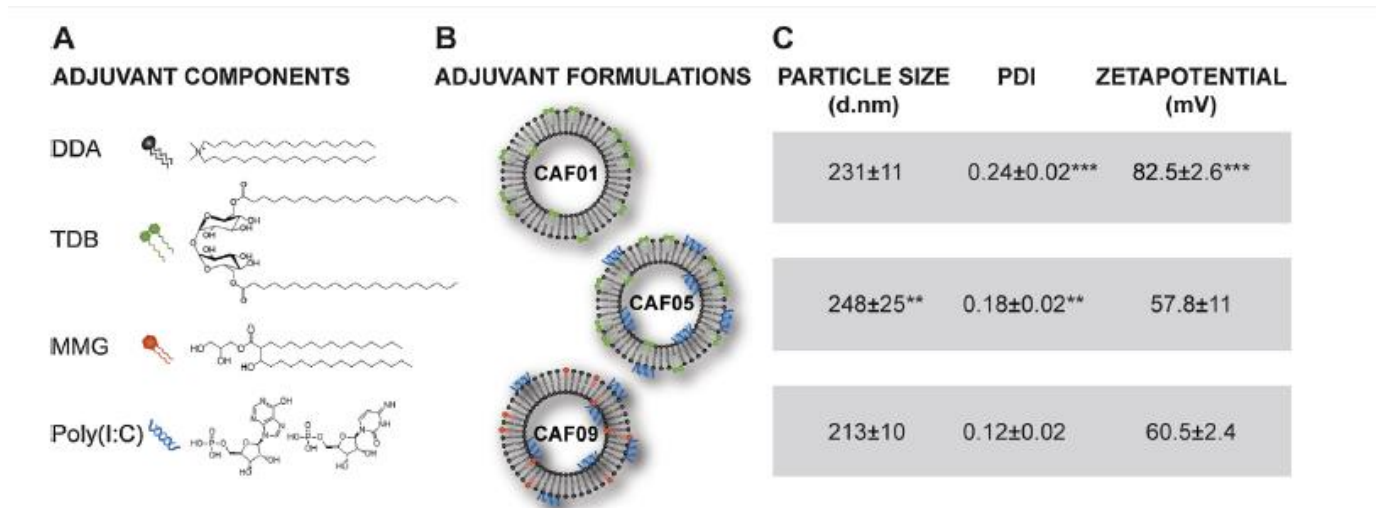


Figura 3. Caracterização na formulação de CAF01,CAF05 e CAF09. (A) composição estrutural, (B) diferença de componentes dos adjuvantes, (C) tamanho, índice de dispersão (PDI) e potencial de carga (zetapotencial). (KORS HOLM et al., 2014).

O CAF01 tem sido utilizado como adjuvante imunomodulador de indução de uma resposta humoral e celular contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* e *Plasmodium yoelii*, AGGER et al., (2008). Como resultados, obteve-se um aumento na resposta celular e humoral nos camundongos infetados e uma resposta protetora contra o patógeno, diminuindo os níveis de colônias bacterianas ou parasitemia, bem como no aumento de anticorpos específicos (IgG1, IgG2b e IgG2c).

Recentemente, o CAF 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 cultura de células Calu-3, uma linhagem de células do epitélio brônquico humano, para 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, e de não 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. Foi observado nesse mesmo estudo 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 et al., 2007, 2009, 2010).

O uso do adjuvante CAF em combinação com LaAg parece ser uma atrativa alternativa na indução de imunidade humoral e celular. Isso se deve, ao sucesso de seu uso como adjuvante por via intranasal já foi demonstrado em outros modelos de infecção. Demonstrando 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.infantum chagasi* por promover uma resposta imune protetora com alta proliferação de células T específicas (TCD4⁺), aumento da produção de IFN- γ , presença de células de memória e altos títulos de anticorpos em conjunto com a diminuição da carga parasitária em baço e fígado, modulando positivamente a resposta imune protetora nos animais vacinados assim, como dosagem baixa de toxidez sistêmica (LEAL et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as diversas limitações existentes no tratamento para Leishmaniose, o desenvolvimento de alternativas profiláticas tornam-se essenciais. Atualmente não existem vacinas aprovadas para a proteção humana contra Leishmaniose, tornando-se urgente a busca e criação de uma vacina que seja eficaz, barata e segura (SRIVASTAVA et al., 2016).

Neste contexto, a vacinação por mucosa intranasal utilizando uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis* (LaAg) em associação com os adjuvantes CAF 01,CAF09 e MPL como potencial de inovar na prevenção da leishmaniose visceral causada por *L. infantum chagasi*.

2.2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos imunogênicos e protetores na administração intranasal dos adjuvantes CAF 09, CAF01 e o MPL em associação com LaAg, frente à infecção murina por *L. infantum chagasi*

2.3.. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1. Avaliação de imunogenicidade e biocompatibilidade da vacina por:

- Análise de DTH
- Análise de TGO,TGP e creatinina

2.3.2. Avaliação da resposta protetora da vacina por:

- Avaliação da carga parasitária no Baço e fígado
- Avaliação da produção de citocinas (IL-4,IL-10e IFN- γ)
- Avaliação da produção de oxido nítrico
- Avaliação da capacidade proliferativa

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

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 Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo sob condições controladas de temperatura, umidade e luz. Os camundongos foram mantidos em gaiolas 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 nº .32/2016.

3.2. CULTIVO DE PARASITOS PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS

Foram utilizadas promastigotas totais de *L. amazonensis* (cepa de referência PH8), cedidas gentilmente pela Profa. Bartira Rossi-Bergmann do Instituto de Biofísica da UFRJ. Estes parasitos foram cultivados na estufa, a 27°C, até o final da fase logarítmica de crescimento em meio Grace (Sigma, USA), pH 6,8 suplementado com 0,2% de Hemina 80% (Sigma, USA), 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 100x) e 5% de urina humana previamente centrifugada a 1500 rpm/24°C/10 min e esterilizado 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 estéril (PBS 1X). O precipitado foi submetido a dez ciclos de aquecimento em banho-maria a 37°C e congelamento em nitrogênio líquido a -196°C. Após a lise, 200 µL do antígeno foram aliquotados para realizar a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) e o restante armazenado em alíquotas a -70°C para posterior utilização.

3.3. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *L.infantum chagasi*

Para a montagem da curva de crescimento dos parasitos, uma cultura de *Leishmania infantum chagasi* (cepa referência PP75) cedida pelo Banco de Cepas de *Leishmania* do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES. Os parasitos foram

cultivados na concentração inicial de 10^6 parasitos/mL por 12 dias em meio Grace's suplementado. Uma alíquota de 10 μ L foi retirada diariamente para realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer. A curva de crescimento foi determinada pelas diferenças em número de parasitas observadas diariamente em relação à concentração inicial.

3.4. PARASITOS PARA INFECÇÃO

Foram utilizados promastigotas de *Leishmania chagasi* (cepa referência PP75) cultivados em Grace's suplementado, pH 6,8. A cultura foi centrifugada a 3000 rpm/5°C/10 min e lavada duas vezes com PBS 1X. O sedimento foi ressuspendido em PBS 1X para realização da contagem das parasitas e posteriores ajustes para uma concentração final de 10^7 *Leishmania*/animal injetados pela veia caudal.

3.5. IMUNIZAÇÃO INTRANASAL

Os camundongos foram divididos em grupos para a realização da vacinação intranasal com auxílio de uma pipeta. A imunização foi realizada em duas doses com um intervalo de duas semanas. Os animais utilizados na avaliação da imunidade protetora foram infectados sete dias após o reforço vacinal e sacrificados duas semanas após a infecção. O tempo de duas semanas corresponde ao pico de carga parasitária no fígado e baço nas condições de infecção utilizadas, conforme avaliação prévia.

| Grupos | Doses 20 μ L |
|--------|-------------------------|
| G1 | PBS 1X |
| G2 | 50 μ g LaAg |
| G3 | 50 μ g LaAg + CAF09 |
| G4 | CAF09 |

Tabela1: Grupos de camundongos e doses das imunizações com CAF09:

| Grupos | Doses 20µL |
|--------|-------------------------|
| G1 | PBS 1X |
| G2 | 50µg LaAg |
| G3 | 50µg LaAg + CAF01 |
| G4 | 50µg LaAg +(MPL+CAF01) |

Tabela 2: Grupos de camundongos e doses das imunizações com MPL e CAF01.

3.6. DOSAGEM DE TRANSAMINASES (TGP E TGO) E CREATININA.

A dosagem de transaminases e creatinina foi determinada por ensaio colorimétrico com o kit comercial Doles®, utilizando soro de animais vacinados. De forma resumida, foi preparada uma curva de calibração contendo diluições seriadas das substâncias padrão, iniciando nas concentrações de transaminases (500 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®).

3.7. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DO BAÇO

Os camundongos eutanasiados tiveram o baço e fígado removidos. O órgão foi macerado em DMEM (Gibco®), pH 7,2, suplementado com 3,7 mg/mL de bicarbonato de sódio, 4,7 mg/mL HEPES (Sigma®) e 10% Soro Fetal Bovino (SFB). O macerado foi transferido para um tubo cônico graduado 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 do baço

foram ressuspensas em 5 mL de DMEM suplementado. O macerado recebeu 3 mL de solução de lise de hemácias (2,06 mg/mL TRIS Base e 7,7 mg/mL cloreto de amônio), 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 (1:50) e transferidas para em câmara de Neubauer para a contagem em microscópio ótico. Após os cálculos, as células tiveram sua concentração ajustada para 5×10^6 /mL e foram plaqueadas no volume de 1 mL em placas de 24 poços (BRANDplates®) contendo ou não o estímulo LcAg (50 µg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas por 4 dias em estufa a 37°C/5% de CO₂ e os sobrenadantes e as células foram utilizados para a realização dos estudos de imunogenicidade e imunidade protetora.

3.8. DOSAGEM DE OXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Resumidamente, foi utilizada uma curva padrão com N₂NO₃, iniciada na concentração de 50 µM. O reagente de Griess foi preparado utilizando-se 2,5g de 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 do sobrenadante das amostras das culturas, em duplicata, em placas de 96 poços. Em seguida os reagentes foram misturados 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 Variokan® (SpectraMax, Molecular Devices).

3.9. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Parte da cultura de esplenócitos, ajustada na concentração de 5×10^6 células/mL foi separada para análise da proliferação de leucócitos totais dos animais vacinados e controles. Para isso, as

células foram marcadas com *Carboxy Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) como descrito a seguir: A suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm/10 min e ressuspendida em uma solução contendo 2 mL de PBS 1X e 2 µL de CFSE 1µM (1:1000) (Invitrogen®). As amostras foram incubadas por 2 minutos e, então, foram adicionadas 5 mL de uma solução contendo SFB e PBS na proporção 1:1. As células foram, novamente, centrifugadas a 1500rpm/10 min, ressuspensas em DMEM + SFB 10% e plaquedas 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 1500 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® 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).

3.10. DOSAGEM DE CITOCINAS

As dosagens de IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram realizadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinizados da eBioscience®, seguindo a recomendação do fabricante. Em síntese, placas de 96 poços de alta absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS1X/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 biotinizado por 1 hora/25°C. As placas foram lavadas, seguido de adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) 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 (H₂O₂) 30 volumens e a reação interrompida com dodecil sulfato de sódio (Gibco®) 1%. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 405 nm. (SpectraMax, Molecular Devices).

3.11. DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA.

A carga parasitária foi determinada utilizando-se de 200 μL da suspensão de células do baço e do fígado dos animais. As amostras foram transferidas 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 subsequentes. 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.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de *two-way ANOVA* e teste T. A análise estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7.0, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas

4. RESULTADOS

4.1. PARTE I

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOGÊNICAS E PROTETORAS DA VACINA LaAg ASSOCIADA AO ADJUVANTE CAF09

4.1.1. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Leishmania infantum chagasi*.

Objetivando determinar o perfil de crescimento do parasita para utiliza-lo nos experimentos de resposta protetora e produção de antígenos, realizamos a curva de crescimento. Os parasitas apresentaram um crescimento logarítmico atingindo o pico de crescimento no dia 8 após o início da cultura, seguido do declínio nos dias consecutivos (Figura 4).

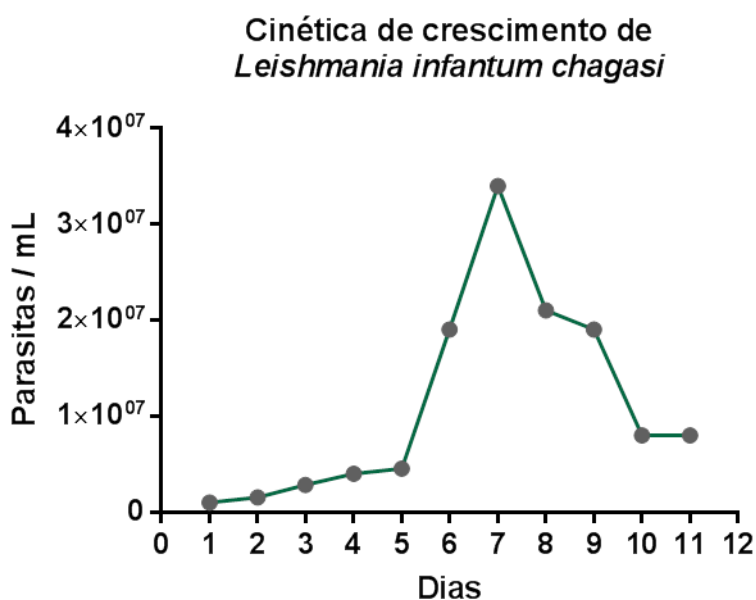


Figura 4: Cinética de crescimento de *L.infantum chagasi* PP75 em meio de cultura Grace's suplementado, pH 6,8. A cultura foi iniciada com uma concentração de 1×10^6 promastigotas/mL e mantida em estufa a 27°C durante 11 dias. Diariamente foi retirada uma alíquota para contagem dos parasitas e determinação da concentração cultura.

4.1.2. BIOCAMPATIBILIDADE DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA *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 creatinina e transaminases (TGO e TGP) (Figura 5) foram determinadas. Utilizamos como controle positivo animais que receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal. Os controles negativos receberam apenas PBS. Conforme podemos observar, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos imunizados. De forma esperada, observamos grandes quantidades de transaminases e creatinina apenas no controle positivo quando comparados aos demais grupos.

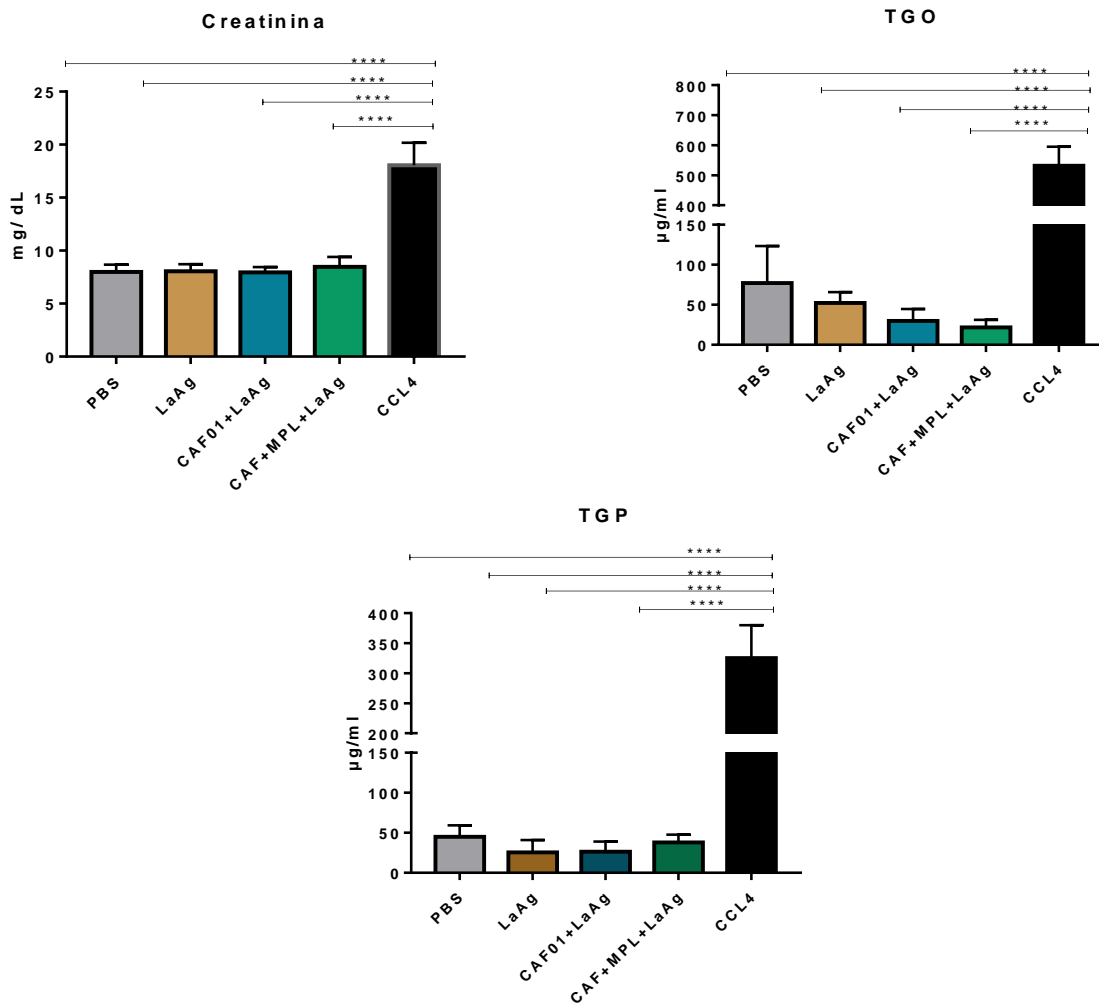


Figura 5: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou não ao adjuvante CAF09 . Dosagem de creatinina (A) e de transaminases TGO (B) e TGP (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. O resultado representa a comparação múltipla de Tukey **** p < 0,0001 em relação ao controle positivo CCl₄.

4.1.3. IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA AO ADJUVANTE CAF09

A proposta de nosso trabalho foi avaliar a vacinação intranasal com LaAg livre ou associada ao adjuvante CAF 09. Os grupos vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF 09 demonstraram uma hipersensibilidade tardia cutânea, com picos significativo de edema com 24 horas após o desafio. (Figura 6). Os demais grupos não apresentaram diferenças entre eles.

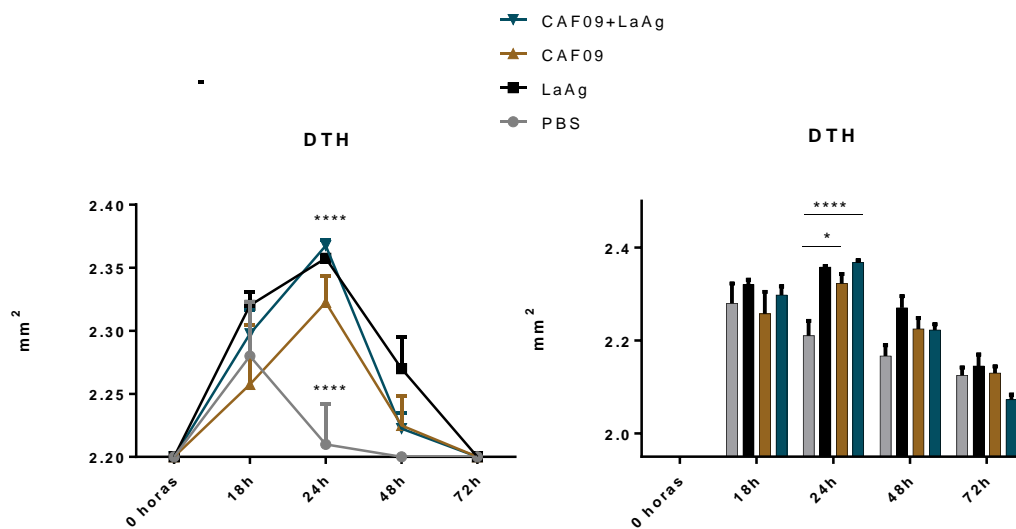


Figura 6: Teste de hipersensibilidade tardia em camundongos pré- vacinados. Análise da hipersensibilidade tardia de camundongos vacinados conforme descrito anteriormente, que receberam 20ug de LaAg na pata. Os dados representam o aumento do edema nos diferentes grupos. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey ****p<0,0001, *p<0,05.

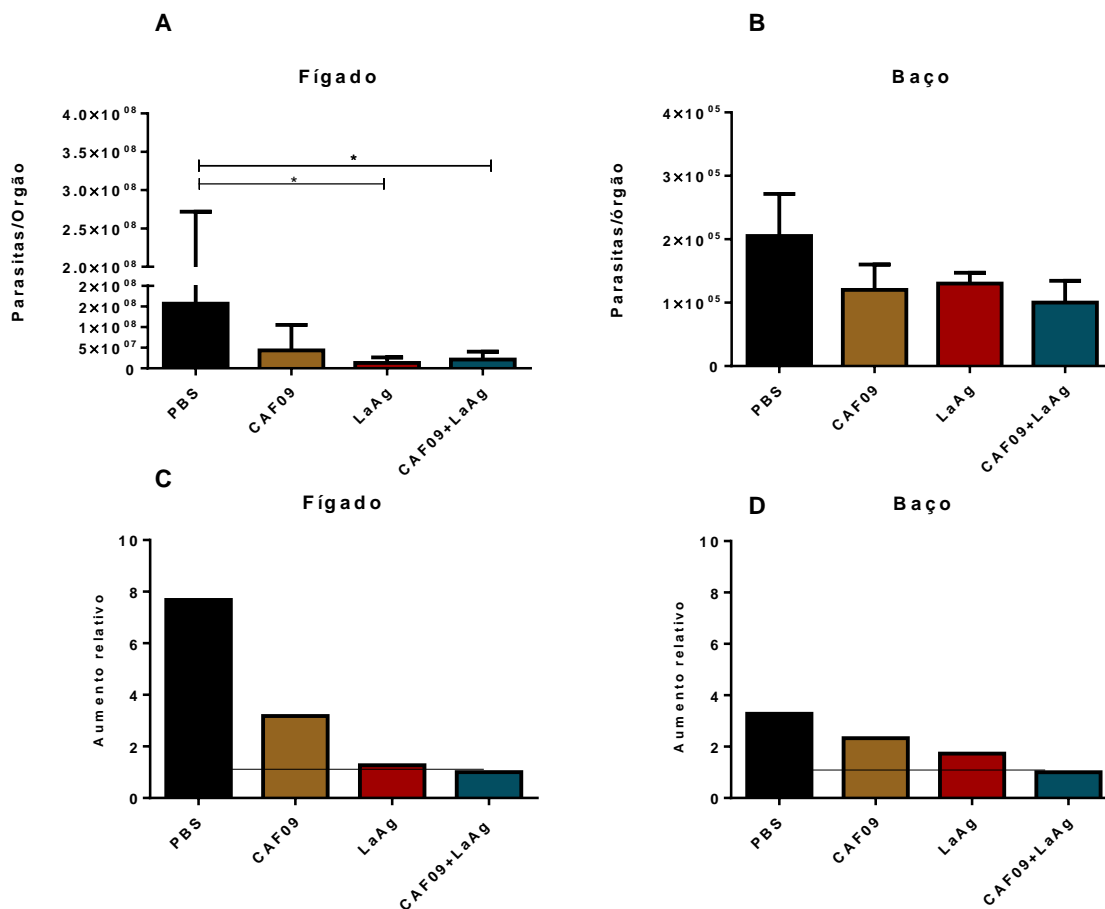


Figura 7. Avaliação do parasitismo no Baço e Fígado de camundongos BALB/c vacinados e infectados. Os animais vacinados foram infectados com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum chagasi* via endovenosa. O número do parasita no fígado (A) e baço (B), foi determinado no através da técnica diluição limitante (LDA), 15 dias após o reforço o aumento relativo foi determinado ao normalizar os dados de parastias por organo dos grupos com grupo CAF09+ LaAg no fígado (C) e baço (D), a línea representa o alienamento do aumento relativo. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey * $p < 0,05$.

Camundongos vacinados com LaAg na forma livre ou associada ao adjuvante apresentaram diminuição significativa da carga parasitária do fígado quando comparado ao grupo controle. Não observamos diferenças entre os grupos PBS e adjuvante sozinho relacionado ao parasitismo de ambos os órgãos. Também não observamos diferenças no parasitismo do baço entre os grupos (Figura 7 A e B). Interessantemente, os animais vacinados com LaAg ou associado ao CAF09

apresentaram uma diminuição relativa significativa no parasitismo de ambos os órgãos,(Figura 7 D e C)

Avaliamos posteriormente a produção ex-vivo de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ por ELISA sanduíche e de NO mediante o método de griess, onde foram observadas significantes diminuições da produção de IL-4 no fígado de camundongos vacinados com LaAg/CAF09 (Figura 8 D). Para as demais não se observou nenhuma diferença (Figura 8).

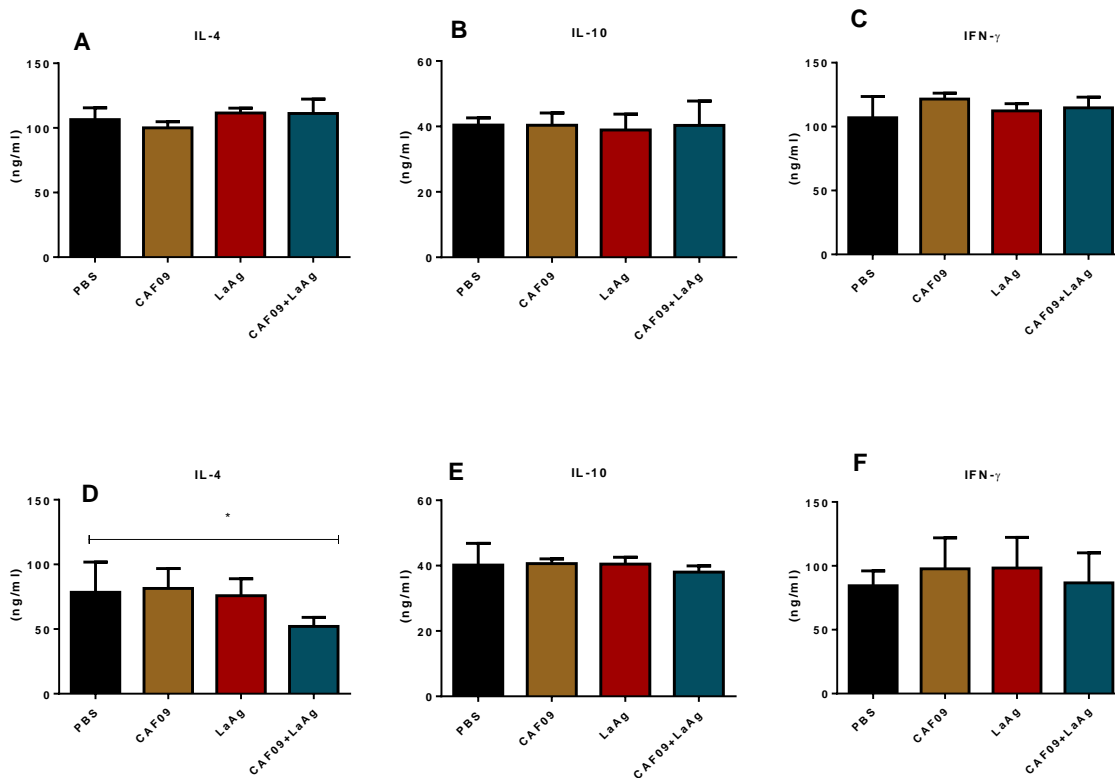


Figura 8. Produção de citocinas em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de IL-4, IL-10 e IFN γ em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L infantum. chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey experimentos com 18 animais cada. * p<0,05.

Observamos uma tendência ao aumento da produção de NO (Figura 9) no baço e fígado de animais vacinados com LaAg livre ou associado ao CAF09 ao serem comparados com grupo controle.

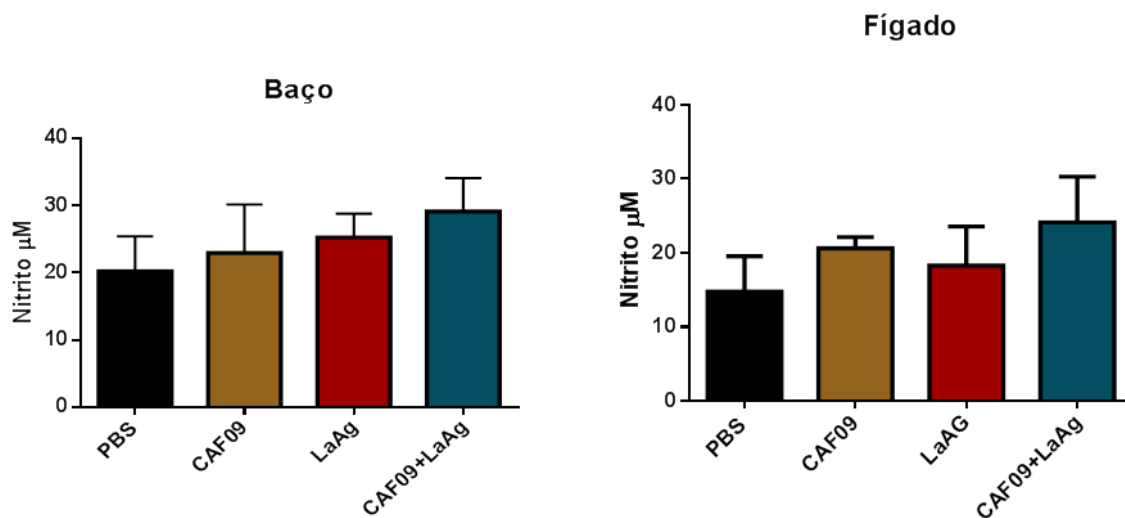


Figura 9. Produção de óxido nítrico em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de NO em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L. infantum chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey experimentos.

4.2. PARTE II

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOGÊNICAS E PROTETORAS DA VACINA LaAg ASSOCIADA AO ADJUVANTE MPL+CAF01

4.2.1. AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DA VACINA

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 creatinina e transaminases (TGO e TGP) (Figura 10) foram determinadas. Utilizamos como controle positivo animais que receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal. Os controles negativos receberam apenas PBS. Conforme podemos observar, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos imunizados. De forma esperada, observamos grandes quantidades de transaminases e creatinina apenas no controle positivo quando comparados aos demais grupos.

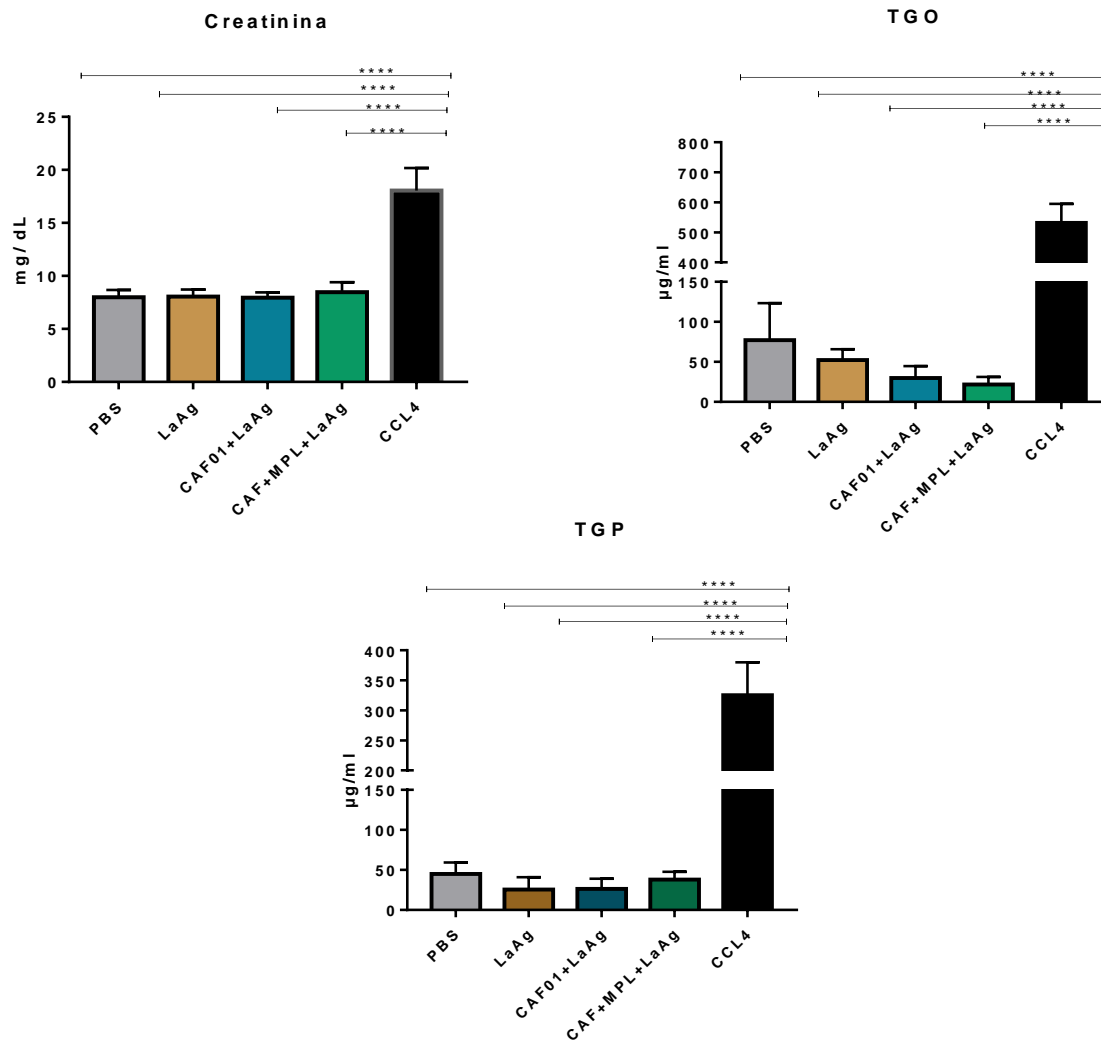
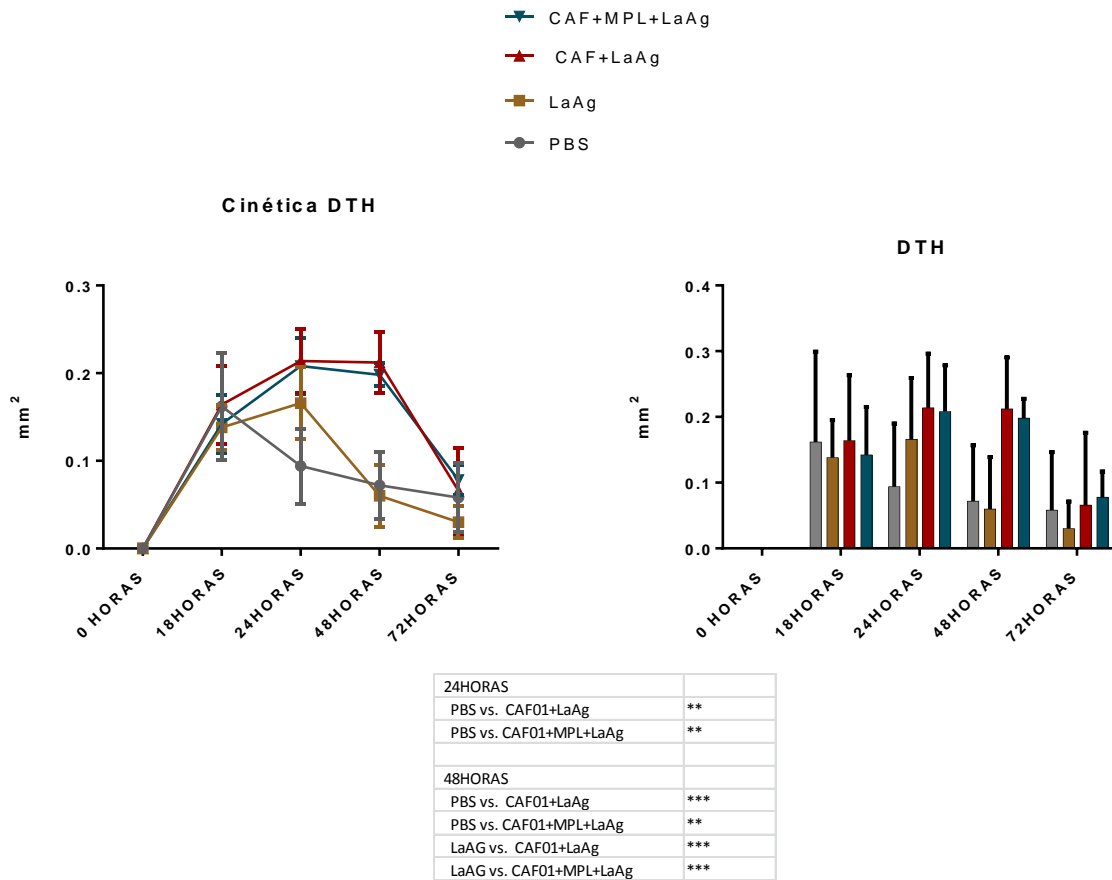


Figura 10: Avaliação da biocompatibilidade da vacina LaAg associada ou aos adjuvantes. Dosagem de creatinina (A) e de transaminases TGO (B) e TGP (C) do soro dos animais eutanasiados 24 horas após a segunda dose da imunização com as formulações vacinais. Controles positivos receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey **** p < 0,0001 em relação ao controle positivo CCl₄.

4.2.2. IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C DA VACINA LaAg LIVRE OU ASSOCIADA AO ADJUVANTE MPL+CAF01.

Visto que as formulações não induziram toxidez, nos produzimos a avaliar os efeitos imunogênicos da vacinação as diferentes formulações. Assim, de maneira semelhante à descrita anteriormente, camundongos foram vacinados com LaAg livre ou associada aos diferentes adjuvantes e desafiados na pata para avaliação da DTH. Assim, os grupos vacinados com LaAg livre ou associado aos adjuvantes CAF 01 ou ao duplo combinado (MPL+CAF 01) demonstraram uma hipersensibilidade tardia cutânea com picos significativo de edema com 24 e 48 horas após o desafio em comparação com grupos controle e aos adjuvantes CAF 01 ou ao duplo combinado (MPL+CAF 01) (Figura 11). Da mesma forma se observa diferença estadística nos grupos CAF 01 ou ao duplo combinado (MPL+CAF 01) ao ser comparados com grupo livre com LaAg nas 48 horas após desafio. Os demais grupos não apresentaram diferenças entre eles.



}

Figura 11: Teste de hipersensibilidade tardia em camundongos pré- vacinados. Análise da hipersensibilidade tardia de camundongos vacinados conforme descrito anteriormente, que receberam 20µg de LaAg na pata. Os dados representam o aumento do edema nos diferentes grupos. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Camundongos vacinados com LaAg na forma livre ou associada aos adjuvantes foram posteriormente desafiados para avaliação da resposta imune protetora contra *L. chagasi*. Foi observado uma diminuição significativa da carga parasitária do baço e fígado quando comparado ao grupo controle. Observamos diferenças entre os grupos PBS e LaAg sozinho relacionado ao parasitismo no baço. Também observamos diferenças no parasitismo no baço e fígado entre os grupos vacinados com CAF01+MPL+LaAg e CAF01+LaAg e ao ser comparado com grupo controle,. Interessantemente os animais vacinados com CAF01+MPL+LaAg apresento significância com grupo imunizado com LaAg (Figura 12 A e B).

Também se pode observar que todos os grupos apresentaram uma diminuição relativa significativa no parasitismo de ambos os órgãos (Figura 12 C e D).Podemos observar que entre os grupos CAF01+MPL+LaAg e CAF01+LaAg não teve diferença estadística, mas ao comparar esses grupos com o antígeno de maneira livre laAg com esses grupos se observa uma diferença estadística na diminuição da carga parasitaria entre LaAg e CAF01+MPL+LaAg tantgo no baço como no fígado nos camundongos de estudo (Figura 12 A e B).

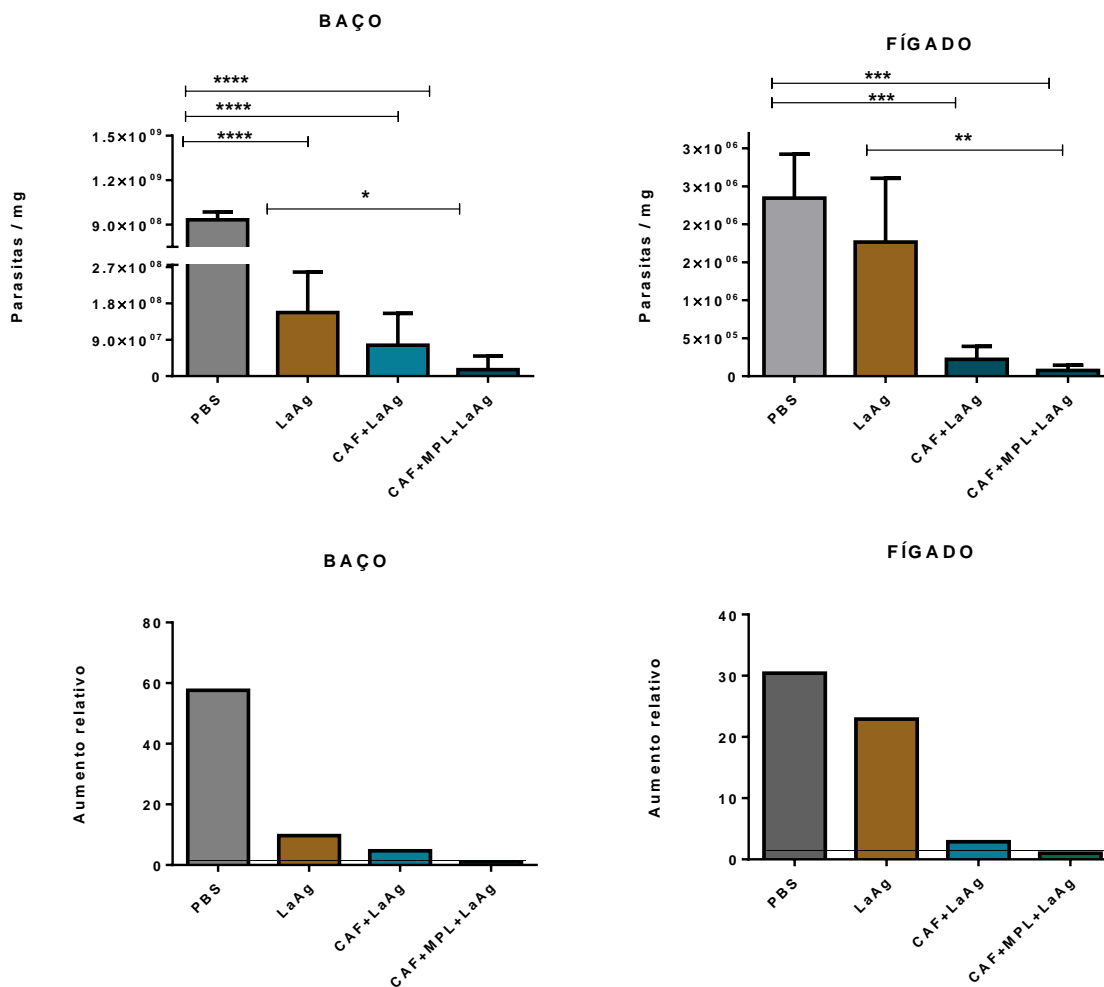


Figura 12. Avaliação do parasitismo no Baço e Fígado de camundongos BALB/c vacinados e infectados. Os animais vacinados foram infectados com 1×10^7 promastigotas metacíclicas de *L. infantum chagasi* via endovenosa. O número do parasita no fígado (A) e baço (B), foi determinado no através da técnica diluição limitante (LDA), 15 dias após o reforço o aumento relativo foi determinado ao normalizar os dados de parastias por organo dos grupos com grupo CAF09+ LaAg no fígado (C) e baço (D) A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e* $p < 0,05$.

Avaliamos posteriormente a produção ex-vivo de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ por ELISA sanduíche e de NO mediante o método de Griess, onde foram observadas significância no fígado na produção de IL-4 (Figura 13 A) no grupo de vacina de estudo CAF01+MPL+LaAg em comparação com PBS e laAg, o IFN- γ (Figura 13 C) se observa um aumento significativo de CAF01+MPL+LaAg em comparação com os distintos grupos de estudo.

No baço de camundongos vacinados com CAF01+MPL+LaAg e CAF01+LaAg (Figura 13). Para as demais não se observou nenhuma diferença. Assim mesmo, observamos uma

significância na produção de NO baço em nos grupo CAF01+MPL+LaAg em comparação com grupo controle e LaAg e uma tendência ao aumento de NO no fígado de animais vacinados associados com CAF01+MPL+LaAg ao ser comparado com grupo controle (Figura 14)

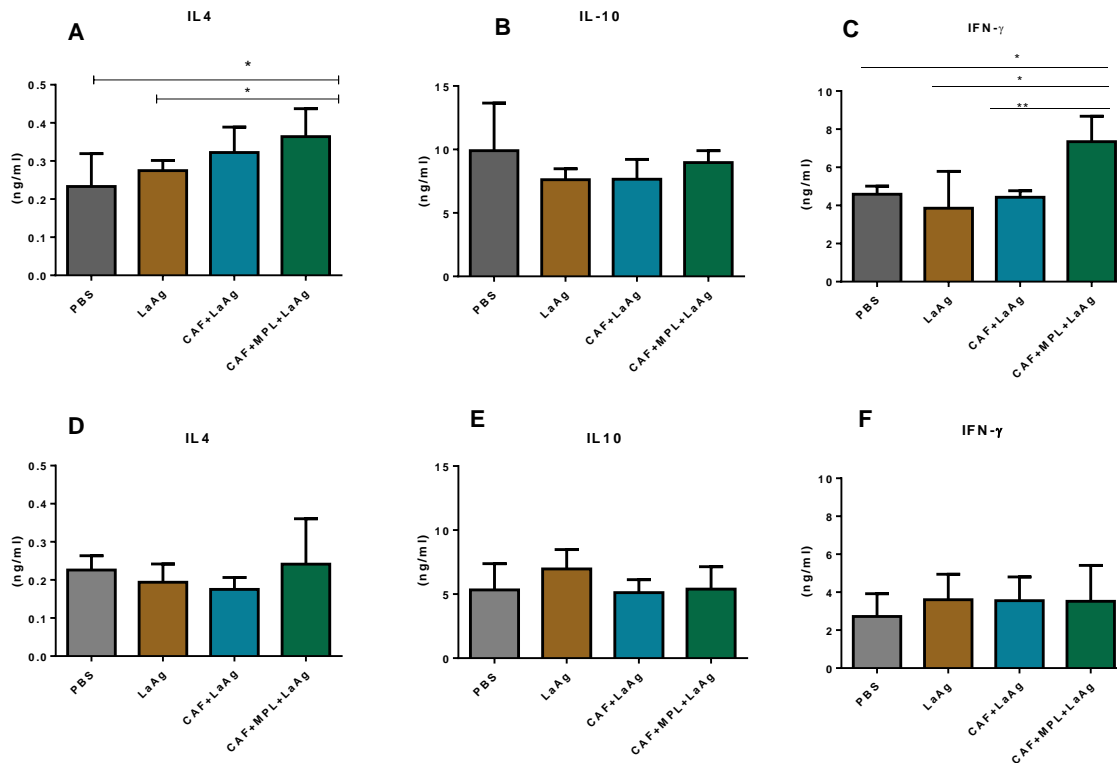


Figura 13. Produção de citocinas em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de IL-4, IL-10 e IFN γ em sobrenadantes do baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L infantum. chagasi*. A significância foi determinada por teste de T test não pareado em experimento com 20 animais cada. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

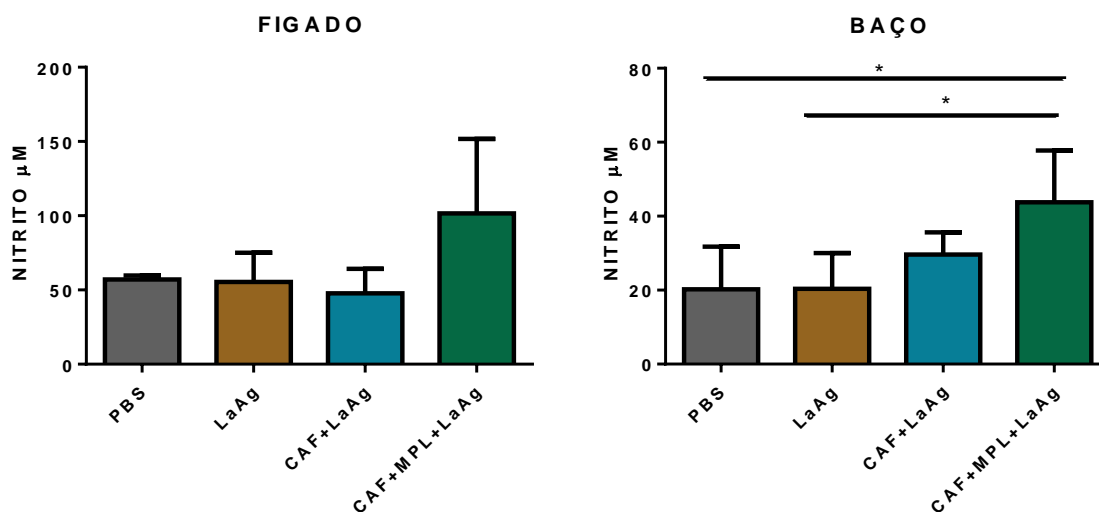


Figura 14. Produção de óxido nítrico em animais vacinados e desafiados com o parasito. Produção de NO em sobrenadantes do baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados por via intranasal com as diferentes formulações e infectados com *L. infantum chagasi*. A significância foi determinada por teste de comparação múltipla de Tukey.

Depois se determinado os efeitos da vacinação sobre a capacidade linfoproliferativa de esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos do parasito. (Figura 15), podemos notar que os animais vacinados com LaAg livre ou associado aos adjuvantes apresentaram porcentagem de proliferação significativamente maiores quando comparados ao grupo controle PBS. Além disso, significantes respostas linfoproliferativas do tipo CD8⁺ foram observadas em resposta ao antígeno nos grupos associados com adjuvante, quando comparado aos controles estimulados.

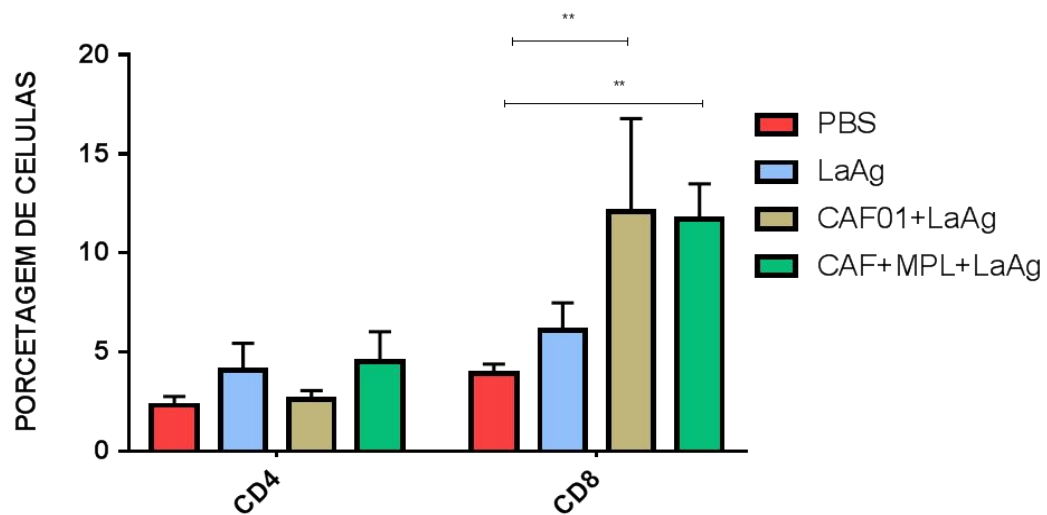
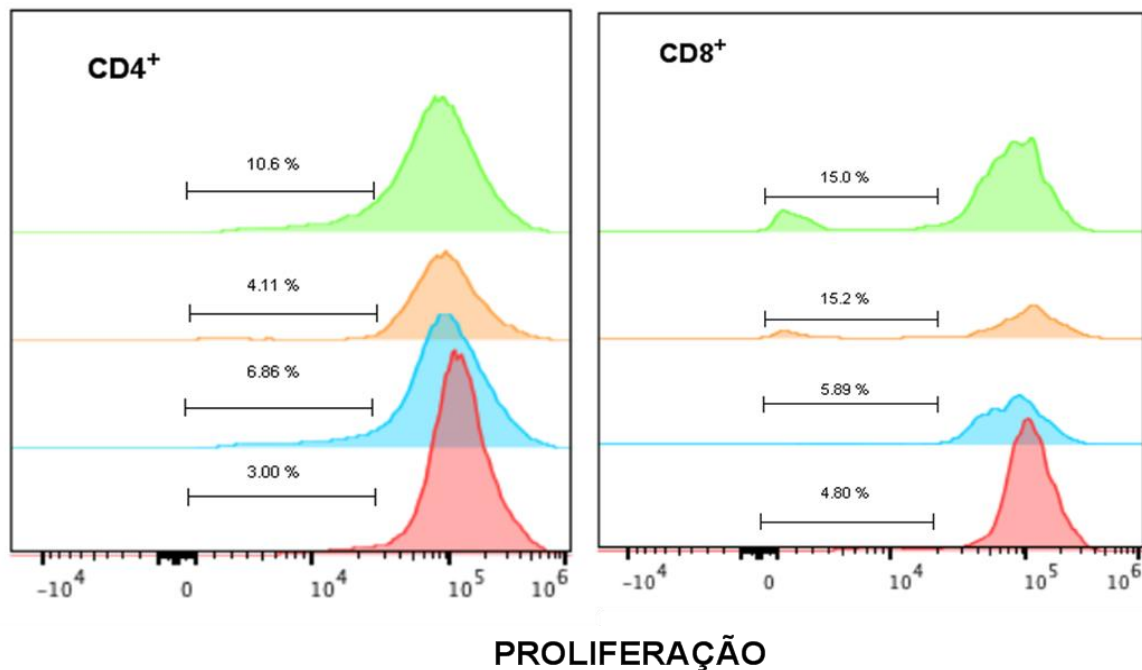


Figura 15: Efeito da vacinação intranasal na resposta linfoproliferativa após o desafio. Esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com LaAg livre ou associado bem como o adjuvante sozinho foram coletados 24 horas após o reforço, marcados com CFSE e reestimulados *in vitro* com 20 µg/mL de LaAg por 72 horas. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressando a porcentagem de células proliferadas. O resultado representa a comparação múltipla de Dunnett ** p<0,01 em relação aos controles.

5. DISCUSSÃO

Como parte dessa procura em melhorar a eficácia da vacina de maneira imunológica no indivíduo contra a leishmaniose visceral, nosso estudo potencializou o efeito protetor da vacina intranasal desafiando os camundongos pós-vacinados com antígeno (LaAg) contra uma infecção provocada por *L. infantum chagasi*. Obtivemos resultados promissores em indivíduos de estudados. Corroborando com os resultados de PINTO et al., (2003), na pesquisa anterior realizada em nosso laboratório com antígeno, demonstrou-se que a indução de IFN- γ em camundongos BALB/c e C57BL/6 ao serem imunizados com LaAg via nasal, causa uma diminuição da lesão subcutânea, oral e hepática e brindam uma expansão da resposta do tipo T_h1, gerando imunidade em relação às lesões provenientes da *L. amazonensis* infectantes.

Nossos resultados demonstram paridade com resultados obtidos por LEAL et al., (2015), nos quais, houve uma diminuição da carga parasitaria, aumento na expressão de NO e citocinas, em especial IFN- γ , utilizando-se LaAg livre e associado com CAF01. Além disso, os autores mostraram que a associação do antígeno com o adjuvante gera uma resposta imunogênica protetora observada pelo aumento na percentagem de linfócitos totais TCD4⁺ e TCD8⁺ em animais vacinados. A utilização de LaAg livre mostrou ter induzido a expansão clonal das células CD4⁺, enquanto que os grupos que receberam o adjuvante associado com antígeno revelaram um aumento significativo de células TCD8⁺. Desta forma, os autores concluem que a resistência à leishmaniose visceral tem sido correlacionada com o aumento da resposta linfoproliferativa, predominante do tipo T_h1, e com aumento da produção de IFN- γ resultando na ativação de macrófagos e morte do parasita (SACKS; SHER, 2002; MANSUETO et al., 2007; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Em outros estudos, nos quais são realizados testes respiratórios com 10⁴ IFU de *Chamydia muridarum* em camundongos, efetuou-se uma vacinação subcutânea utilizando lipossomas catiônicos de dois tipos (CAF 01 e CAF 09), co-formulado com proteína membranal da *C. muridarum* (MOMP), tendo como resultado uma resposta específica no IgG total detectados no soro daqueles pré-vacinados com os adjuvantes e expressando no sobrenadante do macerado do pulmão níveis de expressão de citocinas IFN- γ e IL-4, assim como expressão de IgA e diminuição na expressão IFU de *Chamydia sp*, demonstrando de igual maneira uma resposta tanto

qualitativa como quantitativa a resposta humoral e celular em ambos adjuvantes e uma proteção nos animais de estudo (PAL et al., 2017).

Sabe-se que a formulação dos distintos tipos CAF e dependente principalmente por sua composição bioquímica em sua estrutura dos componentes DDA,TBD,MMG e Poly(I:C) brindando a capacidade desse adjuvante de poder incorporar componentes e, sua função imunológica como adjuvante (KORSHOLM et al., 2014).na qual nosso estudo texto a incorporação do adjuvante MPL em sua estrutura. Sabemos que o MPL é um potente imunoestimulador em conjunto com proteínas recombinantes, tendo resultados de importância nos estudos do Instituto de Investigação de Doenças Infeciosas, nos Estados unidos, em inglês, *Infectious Disease Research Institute* , em estudos virais com hepatites-B (SAFARY et al., 1998; VANDEPAPELIERE et al., 2008), Herpes (BALDRICK et al., 2002), em estudos parasitários contra malária. (FRIES et al., 1992) e *L. major* em combinação com uma poliproteína recombinante conhecida como LeishIII (COLER et al., 2002, 2007), dentre outras doenças infecciosas.

Em outros estudos murinos foram realizados uma vacinação com antígeno de *Leishmania donovani* (gp63+Hsp70+MPL-A), tendo um aumento de IgG2a, IFN- γ e IL-2 no baço como resposta protetora (KAUR; THAKUR; KAUR, 2013). Objetivamos compreender os mecanismos imunológicos associados à resposta imune envolvida na estimulação vacinal, na tentativa de potencializar o efeito protetor da vacina mucosa contra a infecção por *L. infantum chagasi*, devido ao fato de nossa vacina também de ter a presença de CAF01, na qual e um adjuvante imunomodulador de uma resposta humoral e celular contra distintos agentes infecciosos, como *Mycobacterium tuberculosis* , *Chlamydia trachomatis* e *Plasmodium yoelii*, resultados que são demonstrados por AGGER et al.,(2008) onde foi feito o desafio com o uso de adjuvante, em companhia de antígenos causadores de três doenças de inteireis global (Tuberculoses, Clamídia e Malária), expondo também características na diminuição da carga parasitaria em comparação com indivíduos controle em nossa resposta experimental como parte de nossa vacina de estudo.

TRAZER OS DATOS DE RRESULTADOS

Iniciamos nossos estudos analisando o comportamento cinético de crescimento da *Leishmania infantum chagasi* (cepa PP75) em meio de cultura Grace, onde as variações da

concentração de *Leishmania* nos distintos dias de contagem apresentaram um crescimento semelhante aos estudos de GOMES *et al.*, (2007); PINTO *et al.*, (2004) que utilizam a infecção em modelos experimentais murinos, onde foram avaliados a biossegurança e imunogenicidade gerada após as duas imunizações, seguida pela avaliação da imunidade protetora frente ao desafio *in vivo* com *L.infantum chagasi*. A escolha da via intranasal para a administração foi baseada em estudos que já a demonstram como sendo uma via efetiva e capaz de induzir uma imunidade local e sistêmica contra a LV em modelos murinos e em hamster (DE LUCA *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2007; DE MATOS GUEDES *et al.*, 2014)

Prosseguimos nossos estudos sobre Imunogenicidade e proteção em camundongos BALB/C vacinados com LaAg livre ou associada aos adjuvantes. É sabido que a linhagem de camundongos BALB/c pode apresentar uma infecção por *Leishmania infantum chagasi* apresentando sintomas similares aos humanos, que incluem aumento de peso, hepatosplenaomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, e hiperglobulinemia, podendo levar a morte. Estas manifestações se encontram em relação com a expressão da resposta T_{h2} em animais infectados, caso contrário, nos animais que foram infectados e que apresentam maior incidência de resistência contra a doença expressam de maneira dominante uma resposta fenotípica de linhagem T_{h1} da resposta imunológica (REED; ORR; FOX, 2013). essa resposta se manifesta nos distintos grupos que apresentam o antígeno completo (LaAg) livre ou associado a adjuvantes, expressam um aumento de IFN- γ e IL-4 nas dosagens de citosinas, o qual distintos autores determinam que a predominância das duas citosinas expressam a associação de células de resposta T_{h1} em animais resistentes a LV o aumento de IL-4 se durante expressão da doença e um declive após cura, atribuindo assim a importância desta citosina em animais infectados (GHALIB *et al.*, 1993; KENNEY *et al.*, 1998; REED; ORR; FOX, 2013)

Já tendo conhecimento das características CAF 01 e MPL na qual são adjuvantes eficazes em gerar uma forte resposta imunológica mediante a estimulação TLR1, 2,4 e/ou TLR9, apresentando fortes características contra a leishmaniose visceral (BALDRIDGE *et al.*, 2004), clara resposta que se dá ao observar no primeiro grupo a capacidade que o LaAg de diminuir a carga parasitária de animais infectados, assim como indução de IFN- γ em aqueles tratados com antígeno

e, com a presença do adjuvante, a eficiência da vacina é proeminente principalmente no grupo que recebeu em conjunto com dois adjuvantes, o MPL e o lipossoma catiônico de primeira geração CAF01, criando uma potente indução de proteção nos camundongos em associação de antígenos de *L. amazonensis*, isso se observa nos resultados de nossa vacina de estudo CAF 01 + MPL+ laAg ao ser desafiados com *L. infantum chagasi* ativando a expressão de citocinas principalmente de IFN- γ e com sequentemente de NO, ocasionando uma diminuição da carga parasitaria, comparado com controle e LaAg e, incluso em comparação CAF 01+ LaAg composto de nossa anterior vacina de prevenção em estudo.

Sabemos que o desenvolvimento de uma vacina contra *Leishmania sp* facilita o estudo sobre os distintos mecanismos de ativação, bem como os mecanismos que se expressam para atacar o agente infectante mediante a atividade da resposta T_H1 e aumento da expressão de IFN- γ tendo como consequência, uma diminuição da carga parasitaria características que se pode potencializar e dirigir mediante ativação dos TLRs onde reconhecem componentes estruturais, ativando células APC e minutos depois se da ativação de defensas (antibacterianos e antifúngicos) que podem atuar contra os organismos que estão alterando a homeostase. Além disso, ocorre também a produção de citocinas (IL-1 β , IL-2, TNF- α , IFN- γ) as quais ativam uma cascata de sinais que ajudam no direcionamento da resposta adaptativa e na resposta antígeno específica (REED et al 2003).

COLER et al (2002) descreveram a importância de uma resposta T_H1 em modelos experimentais que utilizam camundongos BALB/c utilizando o MPL em compostos oleosos com a proteína LeishIII para ver uma resposta em contraste com adjuvante Alum, onde 14 dias após a infecção os camundongos expressaram uma maior hipersensibilidade, com resultados protetores devido a uso do adjuvante, o qual facilita uma melhora na capacidade de captação do antígeno, ao acionamento do NF- $\kappa\beta$ na ativação de linfócitos e de monócitos, na expressão de marcadores celulares de superfície, na liberação de citocinas pro inflamatórias, quimiocinas e fatores de transcrição (CD44, BCL2, CD38, B7, ICAM-I/CD54, MAPKAPK2, MAP3K, MIG, STAT, dentre outros). O estudo demonstrou a importância da ativação e a eficácia de uma resposta do tipo T_H1 contra uma infecção por *Leishmania sp*.

É sabido que o parasito em seu ciclo biológico e depende do macrófago para sua replicação na sua fase infectante no fagossoma e apresentam uma morfologia de tipo amastigota. Como resposta, a ativação do macrófago estimulada por IFN- γ pode levar a um controle da carga parasitária e a uma resposta resistente contra o parasito. O IFN- γ atua como um medidor da ativação de macrófagos na efetividade de acionamento do metabolismo oxidativo, levando a um controle parasitário intracelular dos parasitos no fagossoma, evitando assim a reprodução celular em sua forma amastigota (LIU; CHANG, 1992).

Além disso, o IFN- γ é uma citocina vinculada à atividade do macrófago no processo de fagocitose como processo inicial de uma cascata de eventos bioquímicos, descrita como atividade oxidativa como função antimicrobiana causando radicais oxidativos onde os compostos químicos estão correlacionados à morte celular parasitaria. Nos estudos feitos por HUGHES em 1988 com *L. donovani* utilizando monócitos humanos, ele associou a capacidade do IFN- γ na geração de H₂O₂ a um tratamento com anti IFN- γ , tendo como efeito adverso O aumento da sobrevivência do parasito. O metabolismo oxidativo do macrófago é um processo de controle imune estudado durante sua infecção intracelular por *Leishmania sp*, *Mycobacterium sp*, *Listeria sp* e *Toxoplasma sp*, sendo que os animais sobreviventes a estas infecções exibem um aumento do tamanho celular, bem como a liberação de enzimas hidrolíticas (proteases e grânulos lisossomais), provocando uma alta capacidade de morte parasitaria (HUGHES, 1988; HUGHES; KASPAR; COPPENHAVER, 1988).

As propriedades moleculares dos agentes infectantes influenciam na caracterização do macrófago, onde eles se dividem em células do tipo M1 e M2, sendo o primeiro o nosso foco de interesse. Estudos de (LIU; CHANG, 1992; DE MUYLDER et al., 2011)descrevem alteração na atividade fagocitária do macrófago em meio de cultura na presença de amastigotas. O macrófagos M1 se caracterizam por ter altos níveis de expressão de citocinas de caraterísticas pro inflamatórias, assim como níveis altos de dosagen de ROS e NO, isso se vê demonstrado nos estudos de (AYBAY; IMIR, 1998; HOLTICK et al., 2011; RYU et al., 2011), nos quais, expõem em seus resultados que o adjuvante MPL é capaz de induzir uma expressão fenotípica de M1 na

qual aumenta a produção de NO, TNF- α , IL6, IL-12. Essa ativação se deve ao fato de que MPL ao ser antagonista do TLR 4 das células APCs e ativa MyD88 através da proteína TIRAP e, mediante de uma cascata ativa, atua sobre proteínas IRAK e TRAF, acionando também MAP3KS e este acionando TAK1, chegando a acionar NF- κ B expressando as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 (quimosina recrutam-te de monócitos), IL-12, IFN- γ e NO, desenvolvendo uma resposta inflamatória do tipo T_{H1}. Essa ativação pode ser influenciada por atividade de IFN- γ sobre os monócitos como sinal persistente da resposta da vacina (SHI et al., 2015).

A avaliação da proliferação específica induzida pela vacina *in vitro* expressa uma expansão celular a diferença dos grupos controle que não apresentam essas respostas linfoproliferativa tanto nas células totais como CD4⁺ e CD8⁺ na qual e mesmo grupo que apresentaram altos índices de parasitismo. Esse perfil corrobora os estudos com LV onde uma resposta com déficit proliferativo de células T antígeno específicas e correlacionado com aumento da carga parasitaria, e com desenvolvimento da doença de forma ativa, caso semelhante em nosso grupo controle onde (GARG R *et al.*, 2006; MELBY PC *et al.*, 2001). Caso que não se observa nos grupos com antígeno livre ou associado adjuvante Lakshmi e colaboradores (2014), observaram um, alguns estudos descrevem que essa capacidade linfoproliferativa *in vitro* tem indicado o sucesso de vacinas contra a infecção por *Leishmania* descrevendo o mesmo padrão de aumento da proliferação de esplenócitos em cultura estimulados com o antígeno solúvel da *Leishmania* em animais previamente imunizados (ALI et al., 2009; LAKSHMI; WANG; MADHUBALA, 2014). Por outro lado, grupos vacinados com LaAg livre ou associado apresentaram um perfil diferente principalmente nas células CD8⁺ onde tem um perfil parasitário baixo.

Alguns antígenos podem gerar uma imunogenicidade de resposta relativamente baixa, na qual depende de sua via de administração e no requerimento de um forte adjuvante que facilite uma resposta imune específica das células T contra o antígeno administrado com uma forte expressão de IFN- γ se crê que de forma indireta as células CTL são células correspondentes na atividade inflamatória e estimulando na liberação IFN- γ e IL-4 onde MPL pode gerar essa resposta humoral ou celular confirmando os estudos experimentais murinos com vacina antirrábica (HU; LIU; ZHU, 2013).

Para combater a leishmaniose é necessário que se dê uma excitação das células monócitos e macrófagos, através das células T CD4⁺ T_{h1} e T CD8⁺ e da liberação de IL-12, IL-5 e IFN γ , favorecendo a ativação das células APC para induzir à função microbicida com a produção de Óxido Nítrico (NO) e, outros radicais de oxigênio em macrófagos e DCs para a eliminação do patógeno Intracelular. (MOSSALAYI et al., 1999; GANTT et al., 2001; KHADEM; UZONNA, 2014; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A proteína IL-12 também estimula a proliferação de clones de células T CD4⁺ T_{h1} e T CD8⁺, mantendo um balanço de número suficiente de células efetoras. Ambas são responsáveis pela ativação da resposta de memória, inclusive nas células fagocitárias, as quais são causantes da morte do parasita através da produção de IFN- γ e IL-5. Também são de muita importância para o controle da infecção por *L. infantum chagasi* em humanos. (SIELING et al., 1994; MARY et al., 1999).

Entretanto, indivíduos com LV mostram um aumento de IL-4 e IL-10 com consequente perda da função do IFN- γ na doença ativa, caracterizando-se por ter uma resposta, majoritariamente, do tipo T CD4⁺ T_{h2}. As investigações sugerem que a IL-10 é a maior contribuinte na supressão da resposta imune inflamatória, atribuindo à permanência patológica e suprimindo as funções das células que atuam contra o patógeno, por exemplo, as células T e APC e diminuindo a expressão e produção das citosinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ (GHALIB et al., 1993; KAYE; SCOTT, 2011; BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Esclarecendo os resultados obtidos na expressão da resposta um ponto que temos que discutir de vital importância e que nossos resultados demonstraram que a utilização da vacina associada com dois distintos adjuvantes não produz alterações paramétricas em nos testes séricos de TGP, TGO e creatinina, resultados também obtidos por LEAL et al (2015). TGP e TGO são aminotransferases amplamente encontradas em muitos tecidos do corpo liberadas na corrente sanguínea quando o tecido for lesado, ocasionando um aumento nos valores de TGP e TGO e por isso são rotineiramente utilizados no monitoramento de lesões cardíacas e hepáticas (ENNULAT et al., 2010)

A interação com TLR 4 eleva a secreção de distintas citocinas inflamatórias a qual facilitam ativação de células B e T e a atividade antagonista do MPL, além de causar um direcionamento mais inflamatório (T_{h1}) e menos tóxico, diferente do LPS, composto do qual ele deriva, como

mostram as análises de creatinina e transaminases (BALDRIDGE et al., 2004). Como observamos em nossos resultados (no análises da creatinina, indicando que não houve indícios de alteração cardíaca, hepática ou renal nos animais vacinados com LaAg, LaAg associado o que mostra ser esta uma vacina segura, devido que a creatinina e gerado da degradação da creatina do músculo na qual e filtrada do sangue pelos rins, sendo assim um biomarcador de lesões renais. De forma diferente, o grupo onde o CCl₄ 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 et al., 2007).

Nos últimos anos de estudo sobre vacinação contra leishmanioses, experimentos vem sendo formulados para estudar a resposta imune em desenhos experimentales principalmente em camundongos na qual procura desfiar as infecções, cutâneas como viscerais median uma resposta imunoprotetora eficiente e potencializada apropriada conta o agente patogênico de uma forma mas sistêmica, com na formulação de antígenos, que sejam capazes de estimular as células T. Essa estimulação se baseia nas características antigênicas na qual seja capaz de gerar uma resposta contra as distintas fases morfológicas do parasito. A existência de candidatos promissores para o desenvolvimento de novas vacinas, tais como Leishmune®, Leish-Tec ® Leishvacin®, o qual tem como objetivo melhorar a eficácia imunológica do indivíduo contra a leishmaniose visceral, que é um foco de inteireis de universidades nacionais e internacionais, principalmente em zonas afetadas (KHAMESIPOUR et al., 2006).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram evidências importantes da imunização intranasal com LaAg, associado aos adjuvantes CAF 09, CAF 01 e MPL, que possuem características físicas e químicas distintas, e sua utilização na estimulação imunológica contra a leishmaniose visceral. Assim, podemos concluir que:

A vacinação intranasal com LaAg/ CAF 01 + MPL, LaAg/ CAF 01 e LaAg/ CAF 09 não apresentou toxidez sistêmica e demonstrou ser um importante candidato de adjuvante associado a vacinas contra leishmaniose.

A associação do LaAg/ CAF 01 + MPL e sua administração por via intranasal promoveu aumento de células TCD4⁺ e CD8⁺ de memória, maior proliferação de células T específicas e aumento da produção de IFN- γ e NO, além de uma resposta imune humoral indicando uma resposta imune mista.

A imunização com LaAg associado ao CAF 09 em camundongos infectados com *L. infantum chagasi* promoveu a diminuição da carga parasitária no fígado, modulando leve resposta imune protetora nos animais vacinados.

A imunização com LaAg associado ao CAF 01 + MPL em camundongos infectados com *L. infantum chagasi* promoveu a diminuição da carga parasitária no baço e no 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 à formulação induziu aumento da imunidade tanto celular quanto humoral, contribuindo para a proteção de camundongos BALB/c contra a LV.

7. REFERÊNCIAS

1. AGGER, E. M.; ROSENKRANDS, I.; HANSEN, J.; BRAHIMI, K.; VANDAHL, B. S.; AAGAARD, C.; WERNINGHAUS, K.; KIRSCHNING, C.; LANG, R.; CHRISTENSEN, D.; THEISEN, M.; FOLLMANN, F.; ANDERSEN, P. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): A versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, 2008.
2. AL-JURAYYAN, N. A. M.; AL-NASSER, M. N.; AL-FAWAZ, I. M.; AL AYED, I. H.; AL HERBISH, A. S.; M-MAZROU, A. M.; AL SOHAIBANI, M. O. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 41, n. 3, p. 143–148, 1995.
3. ALI, S. A.; REZVAN, H.; MCARDLE, S. E.; KHODADADI, A.; ASTEAL, F. A.; REES, R. C. CTL responses to *Leishmania mexicana* gp63-cDNA vaccine in a murine model. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 7, p. 373–383, 2009.
4. ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, v. 252, n. 5480, p. 252, 1974.
5. ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
6. ASHFORD, R. W. **Leishmaniasis reservoirs and their significance in control** *Clinics in Dermatology*, 1996. .
7. ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. **Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania** *Journal of Medical Microbiology*, 2007. .
8. AYBAY, C.; IMIR, T. Comparison of the effects of *Salmonella minnesota* Re595 lipopolysaccharide, lipid A and monophosphoryl lipid A on nitric oxide, TNF- α , and IL-6 induction from RAW 264.7 macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 263–273, 1998.
9. BABALOO, Z.; KAYE, P. M.; ESLAMI, M. B. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 1, p. 85–88, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11280075>>.
10. BADIEE, A.; JAAFARI, M. R.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.;

- KHEIRI, M. T.; BARKHORDARI, F.; MCMASTER, W. R.; MAHBOUDI, F. Enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with liposomal recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63): The role of bilayer composition. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 37–44, 2009a.
11. BADIEE, A.; JAAFARI, M. R.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; KHEIRI, M. T.; BARKHORDARI, F.; MCMASTER, W. R.; MAHBOUDI, F. The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63). **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 362–369, 2009b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.015>>.
 12. BADIEE, A.; JAAFARI, M. R.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; KHAMESIPOUR, A. Coencapsulation of CpG oligodeoxynucleotides with recombinant *Leishmania* major stress-inducible protein 1 in liposome enhances immune response and protection against leishmaniasis in immunized BALB/c mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 668–674, 2008.
 13. BAIOTTO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.
 14. BALDRICK, P.; RICHARDSON, D.; ELLIOTT, G.; WHEELER, A. W. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): An immunostimulatory adjuvant. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 398–413, 2002.
 15. BALDRIDGE, J. R.; MCGOWAN, P.; EVANS, J. T.; CLUFF, C.; MOSSMAN, S.; JOHNSON, D.; PERSING, D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, n. 7, p. 1129–1138, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.4.7.1129>>.
 16. BATES, I.; EKEM, I. Haematological Aspects of Tropical Diseases. In: **Postgraduate Haematology: Seventh Edition**. [s.l.: s.n.]p. 854–869.
 17. BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: What has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659–1667, 2011.
 18. BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and

- their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, 2013.
19. 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. 2146–2160, 2009.
 20. BHAUMIK, S. K.; SINGH, M. K.; KARMAKAR, S.; DE, T. UDP-Gal: N-acetylglucosamine β 1-4 galactosyltransferase expressing live attenuated parasites as vaccine for visceral leishmaniasis. In: Glycoconjugate Journal, 6 SPEC. ISS., **Anais...**2009.
 21. BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1003–1015, 2008.
 22. BLANCO, J. C. G.; BOUKHVALOVA, M. S.; PLETNEVA, L. M.; SHIREY, K. A.; VOGEL, S. N. A recombinant anchorless respiratory syncytial virus (RSV) fusion (F) protein/monophosphoryl lipid A (MPL) vaccine protects against RSV-induced replication and lung pathology. **Vaccine**, v. 32, n. 13, p. 1495–1500, 2014.
 23. BORGHI, S. M.; FATTORI, V.; CONCHON-COSTA, I.; PINGE-FILHO, P.; PAVANELLI, W. R.; VERRI, W. A. *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465–475, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5340-7>>.
 24. BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; RUSSELL, M. W. Terminology: Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 31–37, 2008.
 25. BRASIL, M. D. S.; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Manual de Procedimento do Sistema de Informações sobre Mortalidade. **Manual de Procedimentos do Sistema de Informações sobre Mortalidade**, v. Volume 1, n. 1ª edição, p. 36, 2001.
 26. BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.-P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Parasitology Today**, v. 11, n. 12, p. 445–446, 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169475895800549>>.
 27. CALDAS, A. J.; SILVA, D. R.; PEREIRA, C. C.; NUNES, P. M.; SILVA, B. P.; SILVA, A.

- A.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. Infecção por Leishmania (Leishmania) chagasi em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 445–451, 2001.
28. CANTON, J.; KIMA, P. E. Targeting host syntaxin-5 preferentially blocks leishmania parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental leishmania infections. **American Journal of Pathology**, v. 181, n. 4, p. 1348–1355, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.041>>.
29. CARRILLO, E.; CRUSAT, M.; NIETO, J.; CHICHARRO, C.; THOMAS, M. del C.; MARTÍNEZ, E.; VALLADARES, B.; CAÑAVATE, C.; REQUENA, J. M.; LÓPEZ, M. C.; ALVAR, J.; MORENO, J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1902–1911, 2008.
30. CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. Immunization strategies against visceral leishmaniosis with the nucleosomal histones of Leishmania infantum encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. **Vaccine**, v. 26, n. 20, p. 2537–2544, 2008.
31. CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. Development of Immunization Strategies against Leishmaniosis based on the Leishmania Histones Pathoantigens. **Procedia in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 101–103, 2009.
32. CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A. C. **Deception and manipulation: The arms of Leishmania, a successful parasite** *Frontiers in Immunology*, 2014. .
33. CHENG, C.; BETTAHI, I.; CRUZ-FISHER, M. I.; PAL, S.; JAIN, P.; JIA, Z.; HOLMGREN, J.; HARANDI, A. M.; DE LA MAZA, L. M. Induction of protective immunity by vaccination against Chlamydia trachomatis using the major outer membrane protein adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide coupled to the nontoxic B subunit of cholera toxin. **Vaccine**, v. 27, n. 44, p. 6239–6246, 2009.
34. CHENG, C.; JAIN, P.; BETTAHI, I.; PAL, S.; TIFREA, D.; DE LA MAZA, L. M. A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a chlamydia major outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6641–6649, 2011.
35. CHENG, C.; PAL, S.; TIFREA, D.; JIA, Z.; DE LA MAZA, L. M. A vaccine formulated with a combination of TLR-2 and TLR-9 adjuvants and the recombinant major outer

- membrane protein elicits a robust immune response and significant protection against a *Chlamydia muridarum* challenge. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 3, p. 244–252, 2014.
36. CHRISTENSEN, D.; AGGER, E. M.; ANDREASEN, L. V.; KIRBY, D.; ANDERSEN, P.; PERRIE, Y. Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 2–11, 2009.
37. CHRISTENSEN, D.; FOGED, C.; ROSENKRANDS, I.; LUNDBERG, C. V.; ANDERSEN, P.; AGGER, E. M.; NIELSEN, H. M. CAF01 liposomes as a mucosal vaccine adjuvant: In vitro and in vivo investigations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 19–24, 2010.
38. CHRISTENSEN, D.; FOGED, C.; ROSENKRANDS, I.; NIELSEN, H. M.; ANDERSEN, P.; AGGER, E. M. Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 9, p. 2120–2129, 2007.
39. COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: Putting inna immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492–503, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>>.
40. COLER, R. N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S. G. 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. 4648–4654, 2007.
41. COLER, R. N.; SKEIKY, Y. A. W.; BERNARDS, K.; GREESON, K.; CARTER, D.; CORNELLISON, C. D.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S. G. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4215–4225, 2002.
42. COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **Blood**, v. 95, n. 5, p. 1642–1651, 2000.
43. CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7170–4, 1991. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52255&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

44. CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRITOSVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON JR., W. D.; REED, S. G.; BADARO, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 2, p. 155–158, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7778139>>.
45. DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (3). v. 22, p. 491–502, 2009.
46. DAVIDSEN, J.; ROSENKRANDS, I.; CHRISTENSEN, D.; VANGALA, A.; KIRBY, D.; PERRIE, Y.; AGGER, E. M.; ANDERSEN, P. 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 - Biomembranes**, v. 1718, n. 1–2, p. 22–31, 2005.
47. DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, 2003.
48. DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L.; TOLEDO, V. P.; COSTA, C. A.; GENARO, O.; MENDONÇA, S. C. F. 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. 1179–1185, 1999.
49. DE MATOS GUEDES, H. L.; CARNEIRO, M. P. D.; DE OLIVEIRA GOMES, D. C.; ROSSI-BERGMANN, B.; DE-SIMONE, S. G. **Erratum: Oligopeptidase B from Leishmania amazonensis: Molecular cloning, gene expression analysis and molecular model (Parasitology Research DOI: 10.1007/s00436-007-0552-5)Parasitology Research**, 2007. .
50. DE MATOS GUEDES, H. L.; DA SILVA COSTA, B. L.; CHAVES, S. P.; DE OLIVEIRA GOMES, D. C.; NOSANCHUK, J. D.; DE SIMONE, S. G.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal vaccination with extracellular serine proteases of *Leishmania amazonensis* confers protective immunity to BALB/c mice against infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

51. DE MATOS GUEDES, H. L.; PINHEIRO, R. O.; CHAVES, S. P.; DE-SIMONE, S. G.; ROSSI-BERGMANN, B. Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 33, p. 5491–5496, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.109>>.
52. DE MUYLDER, G.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; ARKIN, M. R.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.
53. DUMONTEIL, E.; JESUS, R. S. M.; JAVIER, E. O.; DEL ROSARIO, G. M. M. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. **Vaccine**, v. 21, n. 17–18, p. 2170–2177, 2003.
54. ENNULAT, D.; MAGID-SLAV, M.; REHM, S.; TATSUOKA, K. S. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. **Toxicological Sciences**, v. 116, n. 2, p. 397–412, 2010.
55. FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE, D. de M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C. de F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.
56. FERRAZ COELHO, E. A.; PEREIRA TAVARES, C. A.; AMORIM CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.
57. FERREIRA, J. H. L.; GENTIL, L. G.; DIAS, S. S.; FEDELI, C. E. C.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Immunization with the cysteine proteinase *Ldcccys1* gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant *Ldcccys1* protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 677–685, 2008.
58. FIUZA, J. A.; GANNAVARAM, S.; SANTIAGO, H. da C.; SELVAPANDIYAN, A.;

- SOUZA, D. M.; PASSOS, L. S. A.; MENDONÇA, L. Z. de; LEMOS-GIUNCHETTI, D. da S.; RICCI, N. D.; BARTHOLOMEU, D. C.; GIUNCHETTI, R. C.; BUENO, L. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; NAKHASI, H. L.; FUJIWARA, R. T. Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. **Vaccine**, v. 33, n. 2, p. 280–288, 2015.
59. FRIES, L. F.; GORDON, D. M.; RICHARDS, R. L.; EGAN, J. E.; HOLLINGDALE, M. R.; GROSS, M.; SILVERMAN, C.; ALVING, C. R. Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 358–62, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48236&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.
60. GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H. L. **Modulation of innate immune mechanisms to enhance *Leishmania* vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules** **Frontiers in Immunology**, 2016. .
61. GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. a; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.
62. GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF- by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2613–2620, 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.5.2613>>.
63. GAUR, U.; SHOWALTER, M.; HICKERSON, S.; DALVI, R.; TURCO, S. J.; WILSON, M. E.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 182–191, 2009.
64. GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A. W.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation**, v.

- 92, n. 1, p. 324–329, 1993.
65. 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, 2001.
 66. GIORGIONE, J. R.; TURCO, S. J.; EPAND, R. M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11634–11639, 1996. Disponível em: <[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38110&tool=pmcentrez&render_type=abstract%5Cnfile:///D:/RESEARCH_PAPERS/Leishmania/protein_kinase_C/#%23Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*.](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38110&tool=pmcentrez&render_type=abstract%5Cnfile:///D:/RESEARCH_PAPERS/Leishmania/protein_kinase_C/#%23Transbilayer_inhibition_of_protein_kinase_C_by_the_lipophosphoglycan_from_Leishmania_donovani.>)>.
 67. GOMES, D. C. de O.; PINTO, E. F.; MELO, L. D. B. de; LIMA, W. P.; LARRAGA, V.; LOPES, U. G.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2168–2172, 2007.
 68. GONTIJO, CÉLIA MARIA FERREIRA; MELO, M. norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004.
 69. GOTO, Y.; BHATIA, A.; RAMAN, V. S.; VIDAL, S. E. Z.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against *L. major* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 21, p. 2884–2890, 2009.
 70. GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.
 71. GREGORIADIS, G.; ALLISON, A. C. Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in pre-immunised mice. **FEBS Letters**, v. 45, n. 1–2, p. 71–74, 1974.
 72. 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. 230–250, 1993. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.6.3.230>>.
 73. GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA Vaccines: Immunology,

- Application, and Optimization. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 927–974, 2000. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.927>>.
74. HABIBI, M.; ASADI KARAM, M. R.; SHOKRGOZAR, M. A.; OLOOMI, M.; JAFARI, A.; BOUZARI, S. Intranasal immunization with fusion protein MrpH·FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Molecular Immunology**, v. 64, n. 2, p. 285–294, 2015.
 75. HAILU, A.; VAN BAARLE, D.; KNOL, G. J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P. A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 182–191, 2005.
 76. HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.
 77. HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4S, p. S45, 2005.
 78. HOLTICK, U.; SCHEULEN, M. E.; VON BERGWELT-BAILDON, M. S.; WEIHRAUCH, M. R. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 3, p. 361–372, 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2011.553187>>.
 79. HU, X.; LIU, R.; ZHU, N. Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1524–1528, 2013.
 80. HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, v. 4, n. 12, p. 340–347, 1988.
 81. HUGHES, T. K.; KASPAR, T. A.; COPPENHAVER, D. H. Synergy of antiviral actions of TNF and IFN- γ : Evidence for a major role of TNF-induced IFN- β . **Antiviral Research**, v. 10, n. 1–3, p. 1–9, 1988.
 82. ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. **Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. .
 83. JENSEN, K. D. C.; SERCARZ, E. E.; GABAGLIA, C. R. Altered peptide ligands can modify

- the Th2 T cell response to the immunodominant 161-175 peptide of LACK (Leishmania homolog for the receptor of activated C kinase). **Molecular Immunology**, v. 46, n. 3, p. 366–374, 2009.
84. KAUR, T.; THAKUR, A.; KAUR, S. Protective immunity using MPL-A and autoclaved *Leishmania donovani* as adjuvants along with a cocktail vaccine in murine model of visceral leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 37, n. 2, p. 231–239, 2013.
85. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>.
86. KENNEY, R. T.; SACKS, D. L.; GAM, a a; MURRAY, H. W.; SUNDAR, S. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, n. 3, p. 815–818, 1998.
87. KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.14.43>>.
88. KHALIL, E. A. G.; EL HASSAN, A. M.; ZIJLSTRA, E. E.; MUKHTAR, M. M.; GHALIB, H. W.; MUSA, B.; IBRAHIM, M. E.; KAMIL, A. A.; ELSHEIKH, M.; BABIKER, A.; MODABBER, F. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: A randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **Lancet**, v. 356, n. 9241, p. 1565–1569, 2000.
89. KHAMESIPOUR, A.; RAFATI, S.; DAVOUDI, N.; MABOUDI, F.; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview . **Indian J.Med.Res.** , v. 123, n. 0971–5916 (Print), p. 423–438, 2006.
90. KIYONO, H.; FUKUYAMA, S. Nalt-versus Peyer’s-patch-mediated mucosal immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 9, p. 699–710, 2004.
91. KOLANOWSKI, S. T. H. M.; LISSENBERG-THUNNISSEN, S. N.; EMAL, D.; VAN HAM, S. M.; TEN BRINKE, A. Monophosphoryl lipid A-induced pro-inflammatory cytokine expression does not require CD14 in primary human dendritic cells. **Inflammation Research**, v. 65, n. 6, p. 449–458, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00011-016-0927-0>>.
92. KORSHOLM, K. S.; HANSEN, J.; KARLSEN, K.; FILSKOV, J.; MIKKELSEN, M.;

- LINDENSTRØM, T.; SCHMIDT, S. T.; ANDERSEN, P.; CHRISTENSEN, D. Induction of CD8+ T-cell responses against subunit antigens by the novel cationic liposomal CAF09 adjuvant. **Vaccine**, v. 32, n. 31, p. 3927–3935, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.050>>.
93. KOYAMA, S.; AOSHI, T.; TANIMOTO, T.; KUMAGAI, Y.; KOBIYAMA, K.; TOUGAN, T.; SAKURAI, K.; COBAN, C.; HORII, T.; AKIRA, S.; ISHII, K. J. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 25, 2010.
94. KRAAIJEVELD, C. A.; LA RIVIERE, G.; BENAÏSSA-TROUW, B. J.; JANSEN, J.; HARMSSEN, T.; SNIPPE, H. Effect of the adjuvant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide on the humoral and cellular immune responses to encephalomyocarditis virus. **Antiviral Res**, v. 3, n. 3, p. 137–149, 1983.
95. LAHIRI, A.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. **Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond** *Vaccine*, 2008. .
96. 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. 3816–3822, 2014.
97. LAUFS, H.; MÜLLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J. C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.
98. LEAL, J. M. iranda; MOSQUINI, M.; COVRE, L. P. olaco; STAGMILLER, N. P. escinalli; RODRIGUES, R. R. ibeiro; CHRISTENSEN, D.; DE MATOS GUEDES, H. L. eonel; GUEDES, H. L. eonel D. M. atos; ROSSI-BERGMANN, B.; GOMES, D. C. l??udio D. O. liviera. Intranasal vaccination with killed *Leishmania amazonensis* promastigotes antigen (LaAg) associated with CAF01 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice challenged with *Leishmania (infantum) chagasi*. **Parasitology**, v. 142, n. 13, p. 1640–1646, 2015.
99. LEE, C.-H.; PARK, S.-W.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; KIM, J. A.; LEE, S. H.; LEE, S.-M. Protective Mechanism of Glycyrrhizin on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 1898–1904,

2007. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/30.1898?from=CrossRef>>.
100. LIEHL, P.; ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M. M. Unveiling the pathogen behind the vacuole. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 589–598, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3504>>.
101. LIÉVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. **FEBS Journal**, v. 283, n. 4, p. 598–607, 2016.
102. LIU, X.; CHANG, K. P. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient Leishmania increases their binding to macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 11, p. 4991–4995, 1992. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.11.4991>>.
103. LOWRY. Lowry Protein Assay. **Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265–275, 1951.
104. MAKALA, L. H. C.; SUZUKI, N.; NAGASAWA, H. **Peyer's patches: Organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine***Pathobiology*, 2002. .
105. MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; RINI, G. B.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. **Immunopathology of leishmaniasis: An update***International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2007. .
106. MARGARONI, M.; AGALLOU, M.; ATHANASIOU, E.; KAMMONA, O.; KIPARISSIDES, C.; GAITANAKI, C.; KARAGOUNI, E. Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble leishmania antigens and modified with a TNF α -mimicking peptide or monophosphoryl lipid aconfers protection against experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6169–6184, 2017.
107. MARGARONI, M.; AGALLOU, M.; KONTONIKOLA, K.; KARIDI, K.; KAMMONA, O.; KIPARISSIDES, C.; GAITANAKI, C.; KARAGOUNI, E. PLGA nanoparticles modified with a TNF α mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 18–31, 2016.
108. MARY, C.; AURIAULT, V.; FAUGÈRE, B.; DESSEIN, A. J. Control of Leishmania infantum infection is associated with CD8⁺ and gamma interferon- and interleukin-5-

- producing CD4+ antigen-specific T cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5559–5566, 1999.
109. MAURÍCIO, IL., STOTHARD, JR., MILES, M. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.
110. MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237–246, 1999.
111. MAYRINK, W.; PINTO, J.; DA COSTA, C.; TOLEDO, V.; GUIMARAES, T.; GENARO, O.; VILELA, L. Short report: evaluation of the potency and stability of a candidate vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 2, p. 294–295, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463682>>.
112. MAZUMDER, S.; MAJI, M.; ALI, N. Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: High immunogenicity and protection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.
113. MAZUMDER, S.; RAVINDRAN, R.; BANERJEE, A.; ALI, N. Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8771–8781, 2007.
114. MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A. J.; SACKS, D. L. J. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO Journal**, v. 8, n. 12, p. 396, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475892901844%5CnISI:A1992JN50600013>>.
115. MCMAHON-PRATT, D.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ZHANG, Y.; MANSON, K.; BERGMAN, C.; RIVAS, L.; RODRIGUEZ, J. F.; LOHMAN, K. L.; RUDDLE, N. H.; ESTEBAN, M. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 8, p. 3351–3359, 1993.
116. MÉNDEZ, S.; BELKAID, Y.; SEDER, R. A.; SACKS, D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 20, n. 31–32, p. 3702–3708, 2002.
117. MESTECKY, J.; MOLDOVEANU, Z.; SMITH, P. D.; HEL, Z.; ALEXANDER, R. C.

- Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1–2, p. 196–200, 2009.
118. MOHAMMADI, M. R.; ZEINALI, M.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. Identification of novel Leishmania major antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. **The Korean journal of parasitology**, v. 44, n. 1, p. 43–48, 2006.
119. MOMENI, A. Z.; JALAYER, T.; EMAMJOMEH, M.; KHAMESIPOUR, A.; ZICKER, F.; GHASSEMI, R. L.; DOWLATI, Y.; SHARIFI, I.; AMINJAVAHERI, M.; SHAFIEI, A.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; HASHEMI-FESHARKI, R.; NASSERI, K.; GODAL, T.; SMITH, P. G.; MODABBER, F. 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. 466–472, 1999.
120. MORENO, J.; NIETO, J.; MASINA, S.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; CARRILLO, E.; NAPP, S.; REYMOND, C.; KAYE, P. M.; SMITH, D. F.; FASEL, N.; ALVAR, J. Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5290–5300, 2007.
121. MOSSALAYI, M. D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitol Today**, v. 15, n. 8, p. 342–345, 1999. Disponível em: <<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407383>>.
122. MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. **Cell biology and immunology of Leishmania** *Immunological Reviews*, 2011. .
123. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. In: Lancet, 9496, **Anais...**2005.
124. MUTISO, J.; MACHARIA, J. C.; KIIIO, M. N.; MUCHERU, P. M.; ONKOBA, W. N.; MALOBA, F. C.; GICHERU, M. M. Leishmania parasite specific CD4 + synergizes and correlates positively with CD8 + T cells in the production of gamma interferon following immunization of the vervet monkey (Chloroce ... **Scientifica Parasitologica**, v. 14, n. 1, p. 7–19, 2013.
125. NAGILL, R.; MAHAJAN, R.; SHARMA, M.; KAUR, S. Induction of cellular and humoral responses by autoclaved and heat-killed antigen of Leishmania donovani in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 58, n. 4, p. 359–366,

- 2009.
126. NASCIMENTO, M. D.; COSTA, J. M.; FIORI, B. I.; VIANA, G. M.; FILHO, M. S.; ALVIM, A. C.; BASTOS, O. C.; NAKATANI, M.; REED, S.; BADARÓ, R.; DA SILVA, A. R.; BURATTINI, M. N. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da leishmaniose visceral no Estado do Maranhão--Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 233–240, 1996.
 127. NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. **Mucosal vaccines: The promise and the challenge** *Nature Reviews Immunology*, 2006. .
 128. NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010. Disponível em: <<http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/135/62876>>.
 129. PABST, R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-Structure, function and species differences. **Vaccine**, v. 33, n. 36, p. 4406–4413, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.022>>.
 130. PAHO/WHO. **PAHO WHO | About the Pan American Health Organization (PAHO)Pan American Health Organization / World Health Organization**, 2017. . Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=91%3Aabout-paho&catid=6822%3Acorporate-pages&Itemid=220&lang=en%0Ahttp://files/933/index.html>.
 131. PAL, S.; TIFREA, D. F.; FOLLMANN, F.; ANDERSEN, P.; DE LA MAZA, L. M. The cationic liposomal adjuvants CAF01 and CAF09 formulated with the major outer membrane protein elicit robust protection in mice against a Chlamydia muridarum respiratory challenge. **Vaccine**, v. 35, n. 13, p. 1705–1711, 2017.
 132. PINHEIRO, R. O.; PINTO, E. F.; DE MATOS GUEDES, H. L.; FILHO, O. A. A.; DE MATTOS, K. A.; SARAIVA, E. M.; DE MENDONÇA, S. C. F.; ROSSI-BERGMANN, B. Protection against cutaneous leishmaniasis by intranasal vaccination with lipophosphoglycan. **Vaccine**, v. 25, n. 14, p. 2716–2722, 2007.
 133. 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. 3534–3541,

- 2003.
134. PINTO, E. F.; PINHEIRO, R. O.; RAYOL, A.; LARRAGA, V.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4521–4527, 2004.
 135. PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.14.103>>.
 136. PROFETA DA LUZ, Z. M.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L.; FIUZA, V. O.; RABELLO, A. [Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 3, p. 249–254, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11460210>.
 137. RAHMAN, K. **Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical interventions in aging**, 2007. .
 138. REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3409>>.
 139. REINER, N. E.; SCHULTZ, L. A.; MALEMUD, C. J. Eicosanoid metabolism by *Leishmania donovani*-infected macrophages: Mouse strain responses in prostanoid synthesis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 1, 1988.
 140. REMME, J. H. F.; BLAS, E.; CHITSULO, L.; DESJEUX, P. M. P.; ENGERS, H. D.; KANYOK, T. P.; KAYONDO, J.; KIOY, D. W.; KUMARASWAMI, V.; LAZDINS, J. K.; NUNN, P. P.; ODUOLA, A.; RIDLEY, R. G.; TOURE, Y. T.; ZICKER, F.; MOREL, C. M. **Strategic emphases for tropical diseases research: A TDR perspective Trends in Microbiology**, 2002. .
 141. RICO, A. I.; ANGEL, S. O.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. **Molecular Immunology**, v. 36, n. 17, p. 1131–1139, 1999.
 142. RYU, M.; KULKARNI, O. P.; RADOMSKA, E.; MIOSGE, N.; GROSS, O.; ANDERS, H. J. Bacterial CpG-DNA accelerates Alport glomerulosclerosis by inducing an M1

- macrophage phenotype and tumor necrosis factor- α -mediated podocyte loss. **Kidney International**, v. 79, n. 2, p. 189–198, 2011.
143. SACKS, D.; SHER, A. **Evasion of innate immunity by parasitic protozoa** *Nature Immunology*, 2002. .
144. SAFARY, A.; VANDEPAPELIERES, P.; SLAOUI, M.; MEHEUS, A. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. v. 16, n. 7, p. 708–714, 1998.
145. SAMANT, M.; GUPTA, R.; KUMARI, S.; MISRA, P.; KHARE, P.; KUSHAWAHA, P. K.; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 470–479, 2009.
146. SANTOS, F. R.; FERRAZ, D. B.; DAGHASTANLI, K. R. P.; RAMALHO-PINTO, F. J.; CIANCAGLINI, P. Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from *Leishmania amazonensis*. **Journal of Membrane Biology**, v. 210, n. 3, p. 173–181, 2006.
147. SANTOS, L. E. R.; COLHONE, M. C.; DAGHASTANLI, K. R. P.; STABELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I.; CIANCAGLINI, P. Lipid microspheres loaded with antigenic membrane proteins of the *Leishmania amazonensis* as a potential biotechnology application. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, n. 1, p. 112–118, 2009.
148. SARKAR, A.; AGA, E.; BUSSMEYER, U.; BHATTACHARYYA, A.; MÖLLER, S.; HELLBERG, L.; BEHNEN, M.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, n. 1, p. 25–35, 2013.
149. SATTI, I. N.; Y. OSMAN, H.; DAIFALLA, N. S.; YOUNIS, S. A.; KHALIL, E. A. G.; ZIJLSTRA, E. E.; EL HASSAN, A. M.; GHALIB, H. W. Immunogenicity and safety of autoclaved *Leishmania major* plus BCG vaccine in healthy Sudanese volunteers. **Vaccine**, v. 19, n. 15–16, p. 2100–2106, 2001.
150. SCHMIDT, S. T.; KHADKE, S.; KORSHOLM, K. S.; PERRIE, Y.; RADES, T.; ANDERSEN, P.; FOGED, C.; CHRISTENSEN, D. The administration route is decisive for the ability of the vaccine adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8⁺T-cell responses:

- The immunological consequences of the biodistribution profile. **Journal of Controlled Release**, v. 239, p. 107–117, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.034>>.
151. SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675–84, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903212%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2189120>>.
 152. SHARIFI, I.; FEKRI, A. R.; AFLATONIAN, M. R.; KHAMESIPOUR, A.; NADIM, A.; AHMADI MOUSAVI, M. R.; MOMENI, A. Z.; DOWLATI, Y.; GODAL, T.; ZICKER, F.; SMITH, P. G.; MODABBER, F. 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. 1540–1543, 1998.
 153. SHI, Y.; FELDER, M. A. R.; SONDEL, P. M.; RAKHMILEVICH, A. L. Synergy of anti-CD40, CpG and MPL in activation of mouse macrophages. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 2, p. 208–215, 2015.
 154. SHIRIAN, S.; ORYAN, A.; HATAM, G. R.; DANESHBOD, Y. Mixed mucosal leishmaniasis infection caused by *Leishmania tropica* and *leishmania major*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3805–3808, 2012.
 155. SIELING, P. A.; WANG, X. H.; GATELY, M. K.; OLIVEROS, J. L.; MCHUGH, T.; BARNES, P. F.; WOLF, S. F.; GOLKAR, L.; YAMAMURA, M.; YOGI, Y.; ET AL. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3639–3647, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7930584>.
 156. SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.
 157. SNIPPEA, H.; REUVER, M. J. D.; KAMPERDIJK, W. A.; VAN DEN BERGH, M.; WILLERS, J. M. N. Adjuvanticity of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide in guinea

- pigs: I. skin test reactions. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 68, n. 3, p. 201–208, 1982.
158. SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/383321>>.
159. SOTO, J.; SOTO, P. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. **Biomédica**, v. 26, n. 1, p. 207–217, 2006.
160. SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R. S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. e57–e61, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/322689>>.
161. SPÄTH, G. F.; CLOS, J. **Joining forces: first application of a rapamycin-induced dimerizable Cre system for conditional null mutant analysis in Leishmania** **Molecular Microbiology**, 2016. .
162. SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>>.
163. STOUTE, J. a; SLAOUI, M.; HEPPNER, D. G.; MOMIN, P.; KESTER, K. E.; DESMONS, P.; WELLDE, B. T.; GARÇON, N.; KRZYCH, U.; MARCHAND, M. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 2, p. 86–91, 1997.
164. TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Review Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>>.
165. TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. **Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis** **Trends in Parasitology**, 2006. .
166. THOMPSON, H. S. G.; DAVIES, M. L.; WATTS, M. J.; MANN, A. E.; HOLDING, F.

- P.; NEILL, T. O.; BEECH, J. T.; LEESMANS, G. D.; ULRICH, J. T. Enhanced immunogenicity of a recombinant genital warts vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A. *v. 16, n. 20, p. 1993–1999, 1999.*
167. TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M.; NETTO, E. M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; DE JESUS, R. S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R. F.; REED, S. G. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f + MPL-SE. **Vaccine**, *v. 28, n. 19, p. 3333–3340, 2010.* Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.089>>.
168. VANDEPAPELIERE, P.; HORSMANS, Y.; MORIS, P.; VAN MECHELEN, M.; JANSSENS, M.; KOUTSOUKOS, M.; VAN BELLE, P.; CLEMENT, F.; HANON, E.; WETTENDORFF, M.; GARCON, N.; LEROUX-ROELS, G. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. **Vaccine**, *v. 26, n. 10, p. 1375–1386, 2008.* Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272264>>.
169. VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, *v. 26, n. 3, p. 78–82, 2010.*
170. VÉLEZ, I. D.; GILCHRIST, K.; ARBELAEZ, M. P.; ROJAS, C. A.; PUERTA, J. A.; ANTUNES, C. M. F.; ZICKER, F.; MODABBER, F. 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. 593–598, 2005.*
171. VÉLEZ, I. D.; GILCHRIST, K.; MARTÍNEZ, S.; RAMÍREZ-PINEDA, J. R.; ASHMAN, J. A.; ALVES, F. P.; COLER, R. N.; BOGATZKI, L. Y.; KAHN, S. J.; BECKMANN, A. M.; COWGILL, K. D.; REED, S. G.; PIAZZA, F. M. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, *v. 28, n. 2, p. 329–337, 2009.*
172. WANG, M.; GAO, Z.; ZHANG, Z.; PAN, L.; ZHANG, Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, *v. 10, n. 12, p. 3544–3551, 2014.*
173. WERNECK, G. L.; BATISTA, M. S. a; GOMES, J. R. B.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, *v. 31, n. 3, p. 174–7, 2003.* Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789476>>.
174. WOODRUFF, A. W.; TOPLEY, E.; KNIGHT, R.; DOWNIE, C. G. B. The Anaemia of

- Kala Azar. **British Journal of Haematology**, v. 22, n. 3, p. 319–329, 1972.
175. YUKI, Y.; KIYONO, H. **New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity** *Reviews in Medical Virology*, 2003. .
176. ZHANG, O.; WILSON, M. C.; XU, W.; HSU, F. F.; TURK, J.; KUHLMANN, F. M.; WANG, Y.; SOONG, L.; KEY, P.; BEVERLEY, S. M.; ZHANG, K. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 12, 2009.