



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CÃES APÓS
IMUNIZAÇÃO COM DOIS ANTÍGENOS RECOMBINANTES
DE *Leishmania chagasi*/*L. infantum* EM ASSOCIAÇÃO A
INTERLEUCINA 12 (IL-12) CANINA**

PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS

**Salvador-Bahia-Brasil
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CÃES APÓS
IMUNIZAÇÃO COM DOIS ANTÍGENOS RECOMBINANTES
DE *Leishmania chagasi*/*L. infantum* EM ASSOCIAÇÃO A
INTERLEUCINA 12 (IL-12) CANINA**

PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS

**Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Co-Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Imunologia

Salvador-Bahia
2007

Ficha Catalográfica elaborada pela

Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia

S237 Santos, Patrícia Oliveira Meira,
Avaliação da resposta imune em cães após imunização com dois antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* / *L. infantum* em associação a interleucina 12 (IL-12) canina / Patrícia Oliveira Meira Santos. – Salvador, 2007.

100 f.; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira.

Co-Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

1. Leishmania. 2. Leishmania infantum. 3. Interleucina-12. 4. Cão. 5. Camundongo. I. Oliveira, Geraldo Gileno de Sá. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.993.161

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CÃES APÓS
IMUNIZAÇÃO COM DOIS ANTÍGENOS RECOMBINANTES
DE *Leishmania chagasi*/*L. infantum* EM ASSOCIAÇÃO A
INTERLEUCINA 12 (IL-12) CANINA**

PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Ajax Mercês Atta
Professor Titular da UFBA
Professor do PPGIm

Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Professor Adjunto da UFBA
Pesquisador Titular da Fiocruz

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador
CPqGM – FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, tendo cada uma delas participação essencial para seu desfecho, seja no trabalho prático, no conhecimento científico e/ou na amizade e carinho dispensados. Gostaria de demonstrar minha gratidão pelo apoio e atenção, dentro e fora do laboratório, durante estes anos de trabalho.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI).

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira.

Aos Dr. Lain C. P. de Carvalho, Dr. Washington Luís C. dos Santos, Dra. Selene Rotres e Dr. Osvaldo Pompilho.

Aos amigos do grupo de pesquisa:

Lenita Ramires, Ricardo Fraga, Cristiane Garboggini, Claudia Santana, Andréa Mendes, Adriano Alcântara, Raimundo Coutinho, Anselmo Souza, Franklin Barbalho, Elivani Sacramento, Antônio Carlos, Micely Hermida, Virgínia Góes, Nathanael Pinheiro, Stella Barrouin e Márcia Aquino

Aos colegas de outros laboratórios:

Marcel Tavares e José Fernando Costa.

À minha família:

Denise, Fabiana e Cauã.

À Dilcea Oliveira e Luciane Tourinho, secretárias do PPGI.

Aos amigos:

Ricardo Oliveira, Bruno Oliveira, Franciane Marques, Paloma Passos, Daniel Cathalá, Karen Rebouças, Thaís Marques, Daniela Lomba, Helaine Mira, Andréa Padre, Torriceli Thé, Hilton Rios e Lilian Afonso

Aos animais, essência da experimentação.

SUMÁRIO

RESUMO	04
ABSTRACT	05
LISTA DE ABREVIATURAS	06
LISTA DE REAGENTES	08
LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	11
1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral Zoonótica	17
2.2 Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Zoonótica	18
2.3 Controle da Leishmaniose Visceral Zoonótica	19
2.4 Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Visceral Zoonótica	20
2.5 A Leishmaniose Visceral no Cão	21
2.6 Antígenos Candidatos a Componentes de uma Vacina contra Leishmaniose Visceral Canina	22
2.7 A Interleucina 12 como Adjuvante Vacinal	24
2.8 Efeitos da Administração da Interleucina 12 <i>in vivo</i>	24
2.9 A Administração de Plasmídeo por Eletroporação	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Avaliação da Resposta Imune Específica de Cães Injetados com Antígenos Recombinantes de <i>Leishmania chagasi/L. infantum</i> e Plasmídeo Codificando IL-12 Canina	28
4.1.1 Obtenção de Antígenos de <i>Leishmania chagasi/L. infantum</i>	28
4.1.1.1 Antígenos Recombinantes de Formas Amastigotas	28
4.1.1.2 Extrato Bruto de Formas Promastigotas	32
4.1.2 Obtenção de Plasmídeo Codificando IL-12 de Cão	33
4.1.3 Avaliação da Resposta Imune Humoral	34

4.1.3.1 ELISA para Mensuração de Anticorpos Reativos a Extrato Bruto de Formas Promastigotas	34
4.1.3.2 ELISA para Mensuração de Anticorpos Reativos a Antígenos Recombinantes de Formas Amastigotas (Lc9 e Lc13)	35
4.1.4 Avaliação da Resposta Imune Celular	35
4.1.4.1 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMNSP) de Cão	35
4.1.4.2 Ensaio para Avaliar a Resposta Linfoproliferativa	36
4.1.4.3 Avaliação da Produção de Interferon Gama (IFN- γ)	36
4.1.4.4 ELISA para Mensuração de Interferon Gama (IFN- γ)	37
4.1.5 Avaliação Parasitológica	38
4.1.6 Animais	38
4.1.7 Imunização	39
4.2 Efeitos da Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação sobre Camundongo.....	40
4.2.1 Obtenção de Plasmídeo Codificando IL-12 Murina	40
4.2.2 Animais	40
4.2.3 Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação sobre Camundongos	41
4.2.4 Avaliação dos Animais Submetidos à Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação sobre Camundongos	42
4.2.4.1 Coleta de Sangue	43
4.2.4.2 ELISA para Determinação de Interferon Gama (IFN- γ)	43
4.2.4.3 Hemograma	44
4.2.4.4 Avaliação da Capacidade Proliferativa de Esplenócitos	44
4.2.4.5 Determinação do Peso Corporal	45
4.2.4.6 Avaliação Morfológica	45
4.2.4.6.1 Determinação de Peso de Órgãos	45
4.2.4.6.2 Histopatologia e Morfometria	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Avaliação da Resposta Imune de Cães Injetados com Antígenos Recombinantes de <i>Leishmania chagasi</i> / <i>L. infantum</i> e Plasmídeo Codificando IL-12 Canina	47
5.1.1 Avaliação da Resposta Imune Humoral	47
5.1.2 Avaliação da Resposta Imune Celular	50
5.1.2.1 Linfoproliferação	50
5.1.2.2 Produção de Interferon Gama (IFN- γ)	52

5.2 Avaliação dos Efeitos da Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 Murina por Eletroporação em Camundongos	54
5.2.1 Avaliação da Concentração de Interferon Gama (IFN- γ) no Plasma	54
5.2.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos	57
5.2.3 Avaliação do Peso Corporal e do Peso de Alguns Órgãos (Fígado, Baço e Linfonodos) .	62
5.2.4 Avaliação Histológica do Baço	68
5.2.5 Avaliação da Resposta Proliferativa de Esplenócitos após Estimulação com Concanavalina A	72
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	79
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10. ANEXOS	95
Anexo 1. Purificação das Proteínas Recombinantes	95
Anexo 2. Dados de Densidade Óptica obtidas no ELISA dos Cães	96
Anexo 3. Cronograma do Experimento Canino	97
Anexo 4. Foto do Eletroporador	98
Anexo 5. Cronograma do Experimento Murino	99
Anexo 6. Valores da Série Vermelha do Experimento Murino.....	100

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CÃES APÓS IMUNIZAÇÃO COM DOIS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi/L. infantum* EM ASSOCIAÇÃO A INTERLEUCINA 12 (IL-12) CANINA. **PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS.** Visando contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, no presente trabalho, foi avaliada a resposta imune de cães após a imunização com dois antígenos recombinantes de *L. chagasi/L. infantum* (denominados Lc9 e Lc13) misturados a saponina em associação ou não com plasmídeo codificando IL-12 canina de cadeia única (pcDNA3.1-scca-IL-12). Os antígenos foram injetados por via subcutânea e o plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 foi administrado diretamente no linfonodo poplíteo drenante, nos dias 0, 21, 42 e 170 do experimento. Nos animais, a geração de anticorpos séricos da classe IgG anti-*Leishmania*, a proliferação e a produção de interferon gama (IFN- γ) por células mononucleares de sangue periférico, após estimulação específica *in vitro*, foram avaliadas. Os cães imunizados com Lc9 e Lc13, associados ou não a pcDNA3.1-scca-IL-12, produziram anticorpos específicos da classe IgG reativos com o extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* e com cada antígeno recombinante separadamente. Contudo, tais animais, não apresentaram resposta proliferativa e tampouco revelaram produção de IFN- γ , após estimulação com extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, indicando que pcDNA3.1-scca-IL-12 falhou em induzir resposta imune do tipo T_H1 a antígenos co-administrados. Por causa disso, experimentos adicionais foram realizados visando à definição, em caráter preliminar, de condições apropriadas para uso de plasmídeo codificando IL-12, capazes de promover resposta imune T_H1 a antígenos co-administrados, na ausência de efeitos tóxicos. Para isso, camundongos da linhagem C3H/HeJ e C57Bl/6 foram injetados duas vezes (50 μ g / dose) com plasmídeo codificando IL-12 murina de cadeia única (pcDNA3.1-scmu-IL-12) e eletroporação local foi realizada. Os camundongos C3H/HeJ revelaram aumento na concentração plasmática de IFN- γ , esplenomegalia, aumento do linfonodo inguinal e aumento do índice de proliferação dos esplenócitos frente a estímulo *in vitro* por concanavalina A. Além disso, os camundongos C3H/HeJ apresentaram, histologicamente, expansão da polpa vermelha associada a grande pleomorfismo celular, aumento no número de macrófagos vacuolados, de megacariócitos e de células apoptóticas. Os camundongos C57Bl/6 exibiram aumento na concentração plasmática de IFN- γ , esplenomegalia e aumento dos linfonodos inguinal e poplíteo. Esses dados sugerem que as quantidades de pcDNA3.1-scmu-IL-12 utilizadas promovem efeitos tóxicos e menores doses do plasmídeo devem ser avaliadas em experimentos para modificação da resposta imune em camundongos.

Descritores: Cão, antígenos recombinantes, interleucina-12, leishmaniose visceral e camundongo.

ABSTRACT

IMMUNE RESPONSE OF DOGS IMMUNIZED WITH TWO *Leishmania chagasi/L. infantum* RECOMBINANT ANTIGENS IN COMBINATION WITH RECOMBINANT CANINE IL-12 (IL-12). **PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS**. The present work was carried out to assess the potential of vaccine candidate antigens against canine visceral leishmaniasis. Herein, canine immune response was evaluated in animals injected with two *L. chagasi/L. infantum* recombinant antigens (named Lc9 and Lc13) in association with a plasmid encoding single-chain canine IL-12 (pcDNA3.1-scca-IL-12) or not, on days 0, 21, 42 e 170. The antigens were injected subcutaneously and the plasmid DNA was administered directly into the draining lymph node. After immunization, seric levels of anti-*Leishmania* antibodies and peripheral blood mononuclear cells proliferation as well as interferon gamma (IFN- γ) production were measured, following *in vitro* stimulation with *Leishmania* crude antigens. Dogs developed specific IgG anti-*Leishmania* antibodies but failed to show both lymphoproliferation and IFN- γ production after *in vitro* stimulation. These data suggests that pcDNA3.1-scca-IL-12 was unable promote a Th1 type of immune response against the co-administered recombinant antigens. Aiming to define the conditions suitable to induce Th1 immune responses against antigens injected in association with plasmid DNA encoding IL-12, without concomitant toxic side-effects, further experiments were carried out in mice. Therefore, CH3/Hej and C57BL/6 mice were injected twice, at two days apart, with 50 μg / dose of plasmid encoding single chain murine IL-12 (pcDNA3.1-scmu-IL-12), followed by electroporation. These mice were followed up for 10 days. The C3H/Hej mice showed an increased of the IFN- γ concentration levels, splenomegaly and inguinal lymphadenopathy. At microscopic evaluation of the spleen, the C3H/Hej mice also showed an increase of the red pulp areas, cellular pleomorphism, megacariocyte, vacuolated macrophage, and apoptotic cell numbers. In addition, splenic cells of these mice developed a higher proliferative response after *in vitro* stimulation with concanavalin A, as compared with control mice, injected with the plasmid without insert. The C57Bl/6 mice showed increased of the IFN- γ concentration levels and developed splenomegaly, popliteal and inguinal lymphadenopathy. These data suggest that the schedule of pcDNA3.1-scmu-IL-12 used herein resulted in toxic side effects and lower amounts should be used in experiments in the attempt to induce murine immune responses of the Th1 type against co-injected antigens.

Key-words: Dog, recombinant antigens, interleukin-12, visceral leishmaniasis, and mouse.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALM – Promastigota de *Leishmania major* Autoclavada

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

cDNA – DNA Complementar

CMNSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

Con A – Concanavalina A

CPqGM – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTH – Teste de Hipersensibilidade Tardia

FML – Fucose Manose Ligante

IFN- γ – Interferon Gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IP – Índice de Proliferação

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzível

IPTG – Isopropil-thio- β -D-galactosídeo

LST – Leishman Skin Test

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVZ – Leishmaniose Visceral Zoonótica

MOPS – Ácido morfolínico-fenil-sulfônico

mRNA – RNA Mensageiro

NK – Células Natural Killer

OVA – Ovoalbumina

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

rpm – Rotação por Minuto

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Duodecil Sulfato de Sódio

SLA – Antígeno Solúvel de *Leishmania major*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TMB – 3,3',5,5' Tetrametil-benzidina

UFC-GM – Unidades Formadoras de Colônia Granulocítica-Macrofágica

LISTA DE REAGENTES

Experimentação Canina:

1) Obtenção de antígenos de *Leishmania chagasi/L. infantum* e de plasmídeo codificando IL-12 de cão:

Plasmídeo pRSET – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA

BL21(DE3)pLysS – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA

TOP10F' – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA

Caldo de Cultura Luria-Bertani – HiMedia, Mumbai, Índia

Extrato de Levedura – Isofar, Duque de Caias, RJ

Cloreto de Sódio – Isofar, Duque de Caxias, RJ

Ampicilina – Sigma-Aldrich

Cloranfenicol – Sigma-Aldrich

Kanamicina – Sigma-Aldrich

Resina de Sepharose Carregada com Níquel – Sepharose Chelating Fast Flow;
Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia

Ácido Deoxicólico – Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany

Acrilamida-bis-acrilamida – BioRad

Meio Schneiders – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA

Soro Bovino Fetal Inativado – Gibco BRL Life Technologies, EUA

Coluna Cromatográfica para Purificação de Plasmídeo – Qiagen, GmbH, Hilden,
Alemanha

Tampões para Purificação de Plasmídeo – Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha

2) Avaliação da resposta imune canina:

Tween 20 – Sigma Chemical Co., EUA

Anticorpo Anti-IgG de Cão Conjugada à Peroxidase – Bethyl Laboratories Inc., EUA

Peróxido de Hidrogênio 30V – Sigma Chemical Co., EUA

Ficoll-Paque Plus – Amersham Biosciences, Suécia

RPMI 1640 – Sigma Chemical Co., EUA
Gentamicina – Sigma Chemical Co., EUA
Soro Fetal Bovino – Gibco BRL Life Technologies, EUA
L-glutamina – Sigma Chemical Co., EUA
2-mercaptoetanol – Sigma Chemical Co., EUA
3,3',5,5' Tetrametilbenzidina – Sigma Chemical Co., EUA
Dimetilsulfóxido – Sigma Chemical Co., EUA
Tampão Acetato de Sódio – Sigma Chemical Co., EUA
Ácido Cítrico – Sigma Chemical Co., EUA
Peróxido de Hidrogênio 30V – Sigma Chemical Co., EUA
Azul de Tripán – Sigma-Aldrich
Timidina Tritiada – Amersham Biosciences, Suécia
Anticorpo Monoclonal Anti-IFN- γ Canino – R&D Systems Incorporation,
Minneapolis, EUA
Anticorpo Policlonal Anti-IFN- γ Canino, Conjugado a Biotina – R&D Systems
Incorporation, Minneapolis, EUA
IFN- γ Canino Recombinante – R&D Systems Incorporation
Estreptavidina-peroxidase – R & D Systems Incorporated

3) Avaliação parasitológica

Meio Schneiders – Sigma-Aldrich

Experimentação Murina:

1) Obtenção de plasmídeo codificando IL-12 murina:

pcDNA3.1 – Invitrogen Inc., EUA
TOP10F' – Invitrogen, Carlsbad, California, EUA
Meio Luria Bertrani – Gibco BRL Life Technologies, EUA

2) Mensuração de IFN- γ :

Anticorpo Monoclonal Anti-IFN- γ Canino – Pharmingen BD Biosciences, EUA

Anticorpo Policlonal Anti-IFN- γ Canino, Conjugado a Biotina – Pharmingen BD Biosciences, EUA

IFN- γ Canino Recombinante – Pharmingen BD Biosciences, EUA

Avidina-peroxidase – Sigma, Chemical Co., EUA

Soro Bovino Fetal – Gibco BRL Life Technologies, EUA

3,3',5,5' Tetrametilbenzidina – Sigma Chemical Co., EUA

3) Proliferação de esplenócitos:

RPMI 1640 – Sigma Chemical Co., EUA

Gentamicina – Sigma Chemical Co., EUA

Soro Bovino Fetal – Gibco BRL Life Technologies, EUA

L-glutamina – Sigma Chemical Co., EUA

2-mercaptoetanol – Sigma Chemical Co., EUA

Azul de Tripán – Sigma Chemical Co., EUA

Timidina Triteriada – Amersham Biosciences, Suécia

4) Fixação para histopatologia

Formalina 10% – Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Duque de Caxias, RJ

LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Experimentação Canina:

1) Obtenção de antígenos de *Leishmania chagasi/L. infantum*:

Incubadora Orbital Orbit Environ Shaker – Lab-Line, Seattle, WA, EUA

Aparelho Ultrasonicador Sonifier Cell Disruptor – Branson Sonic Power Company,
Danbury, Connecticut, EUA

Prep Cell Modelo 491 – Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA

Ultrasonic Processor – PGC Scientifics, Gaithersburg, Maryland, EUA

Irradiador IBL 437C – CIS Biointernational, França

2) Avaliação da resposta imune canina:

Placas de Microtitulação (ELISA) – Cliniplate, Thermo Labsystems, Finlândia

Espectrofotômetro Microplate Reader EL311 (ELISA) – Boehringer Mannheim,
Alemanha

Placas de Microtitulação (linfoproliferação) – Costar, Corning Incorporated, EUA

Câmara de Newbauer – Boeco, Hamburg, Alemanha

Filtro de Fibra de Vidro (linfoproliferação) – Packard Canberra Company, Meriden,
EUA

Contador Beta Direto Matrix 9600 (linfoproliferação) – Packard Canberra Company,
EUA

Placas de Cultura de 6 poços (mensuração de IFN- γ) – Costar Corning Inc., EUA

Placas de Microtitulação (mensuração de IFN- γ) – Corning Incorporated Life Sciences

Espectrofotômetro Emax Precision Microplate Reader (mensuração de IFN- γ)–
Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA

3) Avaliação parasitológica

Sulfato de Atropina – Farmagráfica S.A., Mairiporã, SP

Xilazina – Bayer S.A., São Paulo, SP

Quetamina – Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP

4) Manipulação dos cães antes do início do experimento

Vermífugo (praziquantel / pirantel / febantel) – Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, SP,
Brasil

Amitraz 12,5% – Schering-Plough Veterinária, São Paulo, SP, Brasil

Vacina Ócupla – Fort Dodge Laboratories, USA

Experimentação Murina:

1) Administração de plasmídeo codificando IL-12 murina e coleta de sangue:

Quetamina – Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP

Xilazina – Bayer S.A., São Paulo, SP

Cloridrato de Proximetacaína 0,5% – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo,
SP

2) Mensuração de IFN- γ :

Placas de Microtitulação – Corning Incorporated Life Sciences

Espectrofotômetro Microplate Reader EL311 – Boehringer Mannheim, Alemanha

3) Hemograma:

Hemocitômetro ADVIA 60 Closed Tube – Bayer Health Care, EUA

4) Proliferação de esplenócitos:

Placa de Petri de Poliestireno – Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA

Êmbolo de Seringa – Injex, Industrias Cirúrgicas LTDA, Distrito Industrial Ourinhos,
SP

Câmara de Newbauer – Boeco, Hamburg, Alemanha

Placa de 96 poços – Costar Corning Inc., Nova Iorque, EUA

Filtro de Fibra de Vidro – Packard Canberra Company, Meriden, EUA

Contador Beta Direto Matrix 9600 – Packard Canberra Company, EUA

5) Determinação do peso corpóreo e de órgãos:

Balança Elétrica AS 1000C – Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa
Rita do Sapucaí, Brasil

Balança Ohaus Explorer Analytical Series – Ohaus Corporation, EUA

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo, sendo endêmica na Bacia Mediterrânea, em países do Oriente Médio e na América do Sul.

No Brasil, a LVZ é considerada um grave problema de saúde pública, afetando uma grande área do país, em especial o nordeste brasileiro e os estados de Minas Gerais e Mato Grosso (Grimaldi *et al.* 1989, Evans *et al.* 1992, Tesh 1995; Brasil 2006).

LVZ é uma enfermidade grave que promove cerca de 100 % e 10 % mortalidade na ausência da instalação do tratamento ou quando o tratamento específico é instituído, respectivamente (Boakye *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2005).

O agente etiológico da LVZ é um protozoário que pertence à espécie *Leishmania chagasi/L. infantum* (Mauricio *et al.* 1999). Esse protozoário é um parasita intracelular obrigatório que, no hospedeiro vertebrado, vive em células do sistema fagocítico mononuclear, sendo o cão seu principal reservatório. A transmissão do protozoário para homem ou para o cão se dá, na maioria das vezes, pela picada de insetos vetores, pertencentes gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, infectados (Killick-Kendrick 1999).

O ciclo de vida do parasita tem início quando a fêmea do flebótomo parasitada faz seu repasto sanguíneo e regurgita as formas infectantes, promastigotas metacíclicas, no local da picada, no hospedeiro vertebrado. Após a fagocitose por macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas e, na dependência de condições favoráveis, se reproduzem intracelularmente por divisão binária. Com aumento no número dos microrganismos, a célula infectada pode sofrer ruptura ou realizar exocitose dos protozoários e, de uma dessas maneiras, os parasitos alcançam o meio extracelular (Rittig & Bogman 2000). A partir daí, outras células podem fagocitar formas amastigotas de *Leishmania* e migrar para os linfonodos de drenagem (Moll 1993; Muraille *et al.* 2003) e, posteriormente, poderá ocorrer disseminação do protozoário para diversos órgãos, particularmente os ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (como fígado, baço, medula óssea e linfonodos). Quando flebotomos realizam repasto sanguíneo em indivíduos infectados, em especial no cão, pode ocorrer aquisição de formas amastigotas, as quais irão se transformar em promastigotas no tubo digestivo do vetor. No próximo repasto sanguíneo, o inseto poderá transmitir o protozoário a um novo hospedeiro vertebrado (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>, acesso em 08/02/2007).

A terapêutica atualmente disponível para tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC), que consiste no uso dos mesmos quimioterápicos utilizados no tratamento da enfermidade humana, promove cura clínica temporária, sem causar eliminação completa do parasito. Após a suspensão do tratamento, altas taxas de recidiva podem ser observadas, mesmo sem a exposição a re-infecção (Slappendel & Teske 1997; Moreno *et al.* 1999; Baneth & Shaw 2002). Além disso, após algumas séries do tratamento quimioterápico convencional, aplicadas devido a recidivas, inóculos de *Leishmania* resistentes às drogas tendem a ser selecionados (Gramiccia *et al.* 1992).

Como o cão parece ser o principal reservatório doméstico da infecção, o controle da doença no homem e no cão, provavelmente, poderá ser alcançado através do uso de uma vacina eficaz contra LVC (Tesh 1995, Dye 1996). Para promover o controle da LVZ, tal vacina deveria eliminar ou reduzir drasticamente a capacidade de cães infectados em transmitir o protozoário para o inseto vetor.

A resposta imune protetora contra parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, em modelos murinos, no homem e no cão, exhibe o perfil T_H1 (Pinelli *et al.* 1994, 1995, Ribeiro-de-Jesus *et al.* 1998), onde a ativação de macrófagos por citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ), conduz à destruição ou inibição do crescimento das amastigotas intracelulares (Pinelli *et al.* 2000).

A interleucina 12 (IL-12) é um potente imunomodulador capaz de induzir resposta imune T_H1 a antígenos co-administrados, e expressão de IFN- γ em células NK e linfócitos T ativadas (Hsieh *et al.* 1993, Manetti *et al.* 1993, Ma *et al.* 1995, Trichieri & Scott 1995, Bliss *et al.* 1996). Portanto, essa citocina é uma candidata natural a componente de formulações vacinais ou métodos imunoterápicos onde resposta imune de tipo T_H1 é desejada.

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra LVC, em nosso laboratório, pretende-se avaliar combinações de antígenos recombinantes da forma amastigota de *L. chagasi/L. infantum* e citocinas na indução de resposta imune celular específica protetora em cães. Recentemente, foi confeccionada uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) de *L. chagasi/L. infantum*, em fago lambda, e selecionados clones de fagos recombinantes contendo segmentos de cDNA de *L. chagasi/L. infantum*, através do uso de anticorpos de cão naturalmente infectado, com reação de Montenegro positiva. Dentre os clones selecionados, dois, denominados de Lc9 e Lc13, foram submetidos à excisão *in vivo* para geração de plasmídeos. Posteriormente, os polipeptídeos, codificados pelos cDNAs, foram super-expressos em *Escherichia coli* e, em experimentos preliminares, mostraram-se imunogênicos para camundongos BALB/c (Penha-Filho, M.L. & Fraga, R.E. e colaboradores, dados não

publicados). Em um estudo anterior, realizado em nosso laboratório, uma construção plasmideal contendo um inserto codificando IL-12 recombinante canina, na forma de cadeia única, foi confeccionada (pcDNA3.1-scca-IL-12, Santos *et al.* 2004). Em nosso laboratório, também, foi confeccionada uma construção plasmideal codificando cadeia única de IL-12 murina (pcDNA3.1-scmu-IL-12, Barrouin-Melo e colaboradores, dados não publicados), a partir de cDNA (pCI-neo-IL-12, Noormohammadi *et al.* 2001), gentilmente cedido pela Dra. Emanuela Handman (Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália). Esses plasmídeos mostraram-se ser capazes de promover a produção da proteína recombinante codificada biologicamente ativa.

No presente trabalho, cães foram injetados, por via subcutânea, com duas proteínas recombinantes de *Leishmania chagasi/L. infantum* (Lc9 e Lc13) em associação ou não com a administração de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 em linfonodo drenante, com referência a injeção dos antígenos, e a resposta imune humoral e celular específicos foram avaliadas. Como os animais apresentaram resposta imune humoral e não apresentaram resposta imune celular específica, incluindo os cães submetidos à administração do plasmídeo codificando IL-12, experimentos subseqüentes foram realizados com o objetivo de iniciar o processo de determinação de condições apropriadas para o uso de plasmídeo codificando IL-12, nominalmente, condições adequadas para induzir resposta imune do tipo Th1 a antígenos co-administrados sem induzir, ou induzir minimamente, efeitos tóxicos. Para isso, grupos de camundongos C3H/HeJ ou C57Bl/6 foram injetados duas vezes com plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, com intervalo de dois dias entre as injeções, por via intramuscular e submetidos a eletroporação na região injetada. Nesses animais, foram estudados os níveis séricos de IFN- γ , parâmetros hematológicos, peso corporal e de alguns órgãos (fígado, baço e linfonodos), resposta proliferativa de esplenócitos estimulados com um mitógeno (concanavalina A) e, em caráter, inicial aspectos histológicos do baço.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral Zoonótica

O agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Este protozoário é um parasita intracelular obrigatório com duas formas evolutivas básicas: a) forma amastigota, encontrada nos hospedeiros vertebrados, apresentando predileção em parasitar células do sistema fagocítico-mononuclear e b) promastigota, encontrada no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados (WHO 1990, Brasil 2006).

A espécie causadora da leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) no Velho Mundo, na região do Mediterrâneo e nos países asiáticos, e no Novo Mundo é denominada *L. infantum* e *L. chagasi*, respectivamente (Tesh 1995, Guerin *et al.* 2002, Lainson & Rangel, 2005, Brasil 2006). A enfermidade causada pela *L. infantum* e pela *L. chagasi* exibe aspectos epidemiológicos e clínicos parecidos. Alguns autores, a partir da avaliação do perfil isoenzimático e análise de DNA, passaram a considerar *L. infantum* e *L. chagasi* como a mesma espécie (Momen *et al.* 1987, Maurício *et al.* 1999), enquanto outros preferem manter a denominação clássica devido a diferenças bioquímicas existentes entre as espécies. Provavelmente, as duas espécies de *Leishmania* tiveram um ancestral comum que apresentou uma dicotomia recentemente (Kreutzer *et al.* 1987, Beverley *et al.* 1987, Cupolillo *et al.* 1994, Lainson & Rangel 2005, Brasil 2006).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da *L. chagasi/L. infantum*, enquanto as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) parecem ser reservatórios silvestres (WHO 1990, Abranches *et al.* 1991, Tesh 1995, Gradoni 2001, Brasil 2006). A infecção em cães é mais prevalente e a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos de LV (Brasil 2006). A manutenção do ciclo peridoméstico ocorre pela transmissão do parasita de um cão infectado para um não infectado pela picada do inseto vetor (Moreno e Alvar 2002). Outras formas de transmissão, porém, já foram relatadas na literatura, como transmissão direta cão-a-cão e por transfusão sanguínea (Owens *et al.* 2001, Gaskin *et al.* 2002).

Os insetos dos gêneros *Phlebotomus*, subgênero *Larrousius* (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi* e *P. neglectus*), e *Lutzomyia* são os vetores dos protozoários denominados *L. infantum* e *L. chagasi*, respectivamente (WHO 1990). A principal espécie vetora, no Brasil, é *Lutzomyia longipalpis*. Estudos, contudo, indicam a *Lutzomyia cruzi* como espécie vetora no

Mato Grosso do Sul (Brasil 2006). Esses insetos permitem o desenvolvimento de formas promastigotas ligadas a células do intestino médio. Essa ligação, provavelmente, é mediada por lipofosfoglicanos, principal glicoconjugado presente na superfície celular das promastigotas. Estudos demonstraram um aumento no número de lectinas nas células do intestino médio do vetor após o repasto sanguíneo, indicando sua possível participação na ligação das promastigotas (Killick-Kendrick 2002).

O *Lu. longipalpis* pode alimentar-se em cães e seres humanos, além de outros vertebrados, incluindo o boi, o cavalo, o porco, as galinhas e alguns marsupiais. Não existem indícios de hábitos antropófilos do inseto vetor. Em locais habitados por seres humanos e grande variedade de espécies animais, aparentemente, as fêmeas do inseto vetor entram no domicílio humano para realizar a digestão do sangue ingerido ao alimentar-se em animal de outra espécie. No perímetro periurbano, porém, o homem e os cães são os animais vertebrados mais disponíveis para a alimentação do inseto vetor. Nesta circunstância, os flebótomos infectados podem picar o ser humano e transmitir a *Leishmania*, a qual pode causar a doença humana (Morrison *et al.* 1993, Tesh 1995, Moreno e Alvar 2002).

2.2. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Zoonótica

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) exibe ampla distribuição geográfica, afetando países na Ásia (em especial no Oriente Médio), Europa, África e Américas. Anualmente ocorrem cerca de 500 mil novos casos humanos, sendo que 90 % destes são registrados na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil (WHO 1990, Brasil 2006). Na América Latina, cerca de 90 % dos casos de LVZ são encontrados no Brasil, especialmente na Região Nordeste e em Minas Gerais, onde a enfermidade é considerada um grave problema de saúde pública (Grimaldi *et al.* 1989, Evans *et al.* 1992, Brasil 2006). Entre 1985 e 2002 foram notificados anualmente cerca de 3.156 casos de LV no Brasil. No Estado da Bahia, ocorrem cerca de 500 a 600 novos casos por ano (Cunha *et al.* 1995, Brasil 2006).

Nas últimas décadas, a LV começou a apresentar expansão no mundo (Desjeux 2001; Gramiccia & Gradoni 2005). Fatores demográficos e ecológicos diversos são apontados como responsáveis por essa expansão. Dentre esses fatores, podem ser citados: um intenso desflorestamento aliado ao rápido crescimento e a urbanização da população humana; um grande índice de migração de pessoas, de áreas rurais para as grandes cidades, onde passam a viver em habitações precárias, sem condições sanitárias e com nutrição inadequada; a redução das campanhas de borrifação anti-anofelineos que, possivelmente, permitiu o aumento da

densidade dos flebótomos, e a dispersão do vetor para regiões até então isentas da LVZ. A relativa ineficiência da aplicação dos métodos atuais de controle da LVZ e a disseminação da síndrome da imunodeficiência adquirida também desempenham um papel importante no aumento dos índices dessa enfermidade no mundo (Tesh 1995, Sherlock 1996, Desjeux 2002, Brasil 2006).

2.3. Controle da Leishmaniose Visceral Zoonótica

A atual estratégia de controle recomendada pela Organização Mundial de Saúde é: a) diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, b) eliminação dos reservatórios, c) redução da população do inseto vetor (WHO 1990, Tesh 1995, Brasil 2006). Contudo, essas medidas são onerosas e trabalhosas para serem aplicadas por longos períodos, sendo freqüentemente descontinuadas.

O tratamento dos casos humanos de LV reduz a morbidade e a mortalidade, mas, pouco contribui para a redução do número de novos casos da enfermidade humana.

Para a eliminação dos reservatórios, a infecção é identificada através da soropositividade específica ou pelo encontro do protozoário no cão. Desde 1982, a técnica utilizada para avaliação sorológica é a imunofluorescência, sendo realizada com o eluato de sangue colhido em papel de filtro. Contudo, a técnica realizada dessa maneira apresenta baixa sensibilidade para detecção da infecção canina (Paranhos-Silva *et al.* 1996, Braga *et al.* 1998). Além disso, a amostra sérica pode ter sido obtida no período que antecede a soroconversão e alguns animais podem não produzir anticorpos ou produzir anticorpos específicos apenas transitoriamente (Killick-Kendrick *et al.* 1994), portanto, muitos animais naturalmente infectados podem deixar de ser identificados.

A ausência de sinais clínicos em muitos cães soropositivos, especialmente nos estágios iniciais da LVZ, contribui para a recusa da entrega dos animais para o sacrifício, por parte dos proprietários (Tesh 1995), possibilitando que esses cães permaneçam como fonte de infecção para os insetos vetores.

O controle do vetor está baseado, principalmente, no combate aos insetos na fase adulta e consiste no uso de inseticidas residuais, com objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o vetor e a população humana, diminuindo o risco de transmissão do parasito. Essa medida, porém, tem efeito apenas temporário na redução da população peridoméstica de flebótomos (Tesh 1995, Brasil 2006).

Atualmente, no Brasil, são utilizados os inseticidas piretróides para a pulverização ambiental, cipermetrina ou deltametrina, que apresentam atividade residual de três meses (Brasil 2006). Os programas de pulverização são frequentemente descontinuados, e as comunidades se tornam reinfestadas pelos insetos vetores.

2.4. Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Visceral Zoonótica

A definição do tipo de resposta imune a um determinado antígeno depende do engajamento de linfócitos T de subpopulações distintas, entre eles as células T auxiliaadoras do tipo T_H1 e T_H2 (Mosmann e Coffman 1989). As células T auxiliaadoras, $CD4^+$, podem ser separadas nas linhagens do tipo T_H1 e T_H2 , de acordo com o padrão de citocinas secretadas, sendo o desenvolvimento de uma, ou da outra, subpopulação influenciado por diferentes fatores, em especial, pela exposição inicial a citocinas. As células T_H1 secretam principalmente interferon- γ (IFN- γ) e interleucina (IL)-2, e as células T_H2 secretam predominantemente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Existe um controle recíproco entre as duas subpopulações de células T auxiliaadoras, o qual é promovido pela atividade antagônica de citocinas produzidas por cada linhagem celular (Powrie *et al.* 1993, Hofstra *et al.* 1998, Cotrez *et al.* 2000).

A resposta imune protetora contra parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* em modelos murino, canino e humano, está relacionada ao aumento dos linfócitos T $CD4^+$ do tipo T_H1 e à produção de IFN- γ e IL-2, citocinas que promovem ativação de macrófagos e/ou de linfócitos citotóxicos (Pinelli *et al.* 1994, 1995, Ghalib *et al.* 1995, Ribeiro-de-Jesus *et al.* 1998). O controle da multiplicação do parasito em macrófagos depende da produção de óxido nítrico induzida pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). A transcrição desta enzima é induzida por IFN- γ e por citocinas como IL-2 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Belosevic *et al.* 1990).

A susceptibilidade à infecção pela *Leishmania* parece estar associada com o aumento dos linfócitos T $CD4^+$ do tipo T_H2 e produção predominante das citocinas IL-4, IL-5 e, principalmente, IL-10 (Carvalho *et al.* 1994, Ghalib *et al.* 1995), além de hipergamaglobulinemia, devido à ativação policlonal de linfócitos B (Kharazmi *et al.* 1999). Outros autores encontraram, simultaneamente, altos níveis de IFN- γ e IL-10 no soro de pacientes, indicando que ambos subgrupos de células T auxiliaadoras estão ativadas durante o curso da doença (Cillari *et al.* 1995).

Durante a fase aguda da LV, os seres humanos não desenvolvem hipersensibilidade tardia específica (“leishmanin skin test”, LST), porém, após 6 a 12 meses do tratamento bem sucedido, os indivíduos passam a apresentar reatividade cutânea a extrato bruto de antígenos de *Leishmania*. Por outro lado, indivíduos com a forma subclínica ou assintomática da infecção revelam tendência a produzir pequenas quantidades de anticorpos anti-*Leishmania*, resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ , após estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania*, e podem exibir hipersensibilidade cutânea tardia específica (Badaro *et al.* 1986; Carvalho *et al.* 1992).

A dicotomia T_H1/ T_H2 na resposta das células T contra a *Leishmania* sugere que o balanço entre as duas populações de linfócitos T específicas determina a evolução da infecção (Kemp *et al.* 1994, 1996).

2.5. A Leishmaniose Visceral no Cão

Os cães infectados com *L. chagasi/L. infantum* podem apresentar formas clínicas sintomáticas ou assintomáticas. Após a infecção, os cães podem: a) permanecer em um estado pré-patente, progredindo mais tarde para o desenvolvimento da doença, b) permanecer por longos períodos de tempo sem apresentar manifestações clínicas, ou c) curar-se espontaneamente. Os animais pertencentes ao primeiro grupo são considerados susceptíveis, e os cães dos dois últimos grupos são denominados resistentes à infecção por *L. chagasi/L. infantum* (Cabral *et al.* 1998).

A imunidade celular específica parece ser capaz de promover o controle da infecção e manter o animal assintomático. Pinelli e colaboradores (1994) demonstraram que linfócitos de cães resistentes são capazes de proliferar, produzir de IL-2 e TNF, e apresentar hipersensibilidade cutânea tardia, após estimulação por extrato de antígenos de *Leishmania*.

Na transição do estado assintomático para doença, ocorre supressão da resposta proliferativa de linfócitos (Bourdoiseau *et al.* 1997, Moreno *et al.* 1999, Rhalem *et al.* 1999). Na ausência resposta imune celular, pode ocorrer progressão para o desenvolvimento da doença (Pinelli *et al.* 1994, Cabral *et al.* 1998, Rhalem *et al.* 1999, Leandro *et al.* 2001). Cães sintomáticos apresentam uma significativa redução no nível de células T CD4⁺ com baixa resposta linfoproliferativa *in vitro* a fração solúvel do extrato de antígeno de *Leishmania* (Moreno *et al.* 1999), ativação policlonal de linfócitos B pelos antígenos parasitários e altos títulos de anticorpos específicos (Gradoni 2001).

Diferentes subclasses de IgG com reatividade a antígenos de *Leishmania* podem ser produzidas, incluindo IgG1 e IgG2. O significado da predominância da produção de IgG1 ou IgG2 na LV canina ainda não foi elucidado, alguns estudos mostram resultados contraditórios (Leandro *et al.* 2001; Oliveira Mendes *et al.* 2003).

2.6. Antígenos Candidatos a Componentes de uma Vacina contra Leishmaniose Visceral Canina

A prevenção da LV em cães, provavelmente, deve ser uma das formas mais efetivas de interromper o ciclo doméstico dessa parasitose. A utilização de uma vacina eficaz teria vantagens sobre as estratégias de controle da doença atualmente empregadas. A vacinação ocasionaria redução de aporte de novos cães susceptíveis para as áreas endêmicas e teria grande aceitação por parte da população, por evitar o sacrifício canino atualmente empregado.

O processo de validação, teste de segurança e aprovação de uma vacina para uso animal, comparada para uso em humanos, é mais simples.

Algumas formulações candidatas a vacinas contra LVC estão em fase de teste ou foram testadas sem, contudo, induzirem proteção ou induzindo proteção apenas parcial em estudos de fase III.

Em 1988, Frommel e colaboradores demonstraram a capacidade de uma fração de proteínas purificadas de formas promastigotas de *Leishmania chagasi/L. infantum*, com peso molecular de 94-67 kDa (denominada LiF2), de proteger camundongos BALB/c contra infecção experimental com *Leishmania mexicana* e *Leishmania major*. Em seguida, Ogunkolade e colaboradores (1988) imunizaram 12 cães com LiF2. Os animais imunizados com LiF2 associado ao adjuvante N-acetil-muramilo-L-alanina-D-isoglutamina (MDP) produziram anticorpos específicos. Mais tarde, Dunan e colaboradores (1989) estudaram efeitos da vacina candidata em cães residentes em uma área endêmica para LV na França. Para isso, foram utilizados 393 cães. Os cães foram avaliados por dois anos e não houve diferença entre as taxas de soroconversão ou encontro de amastigotas no baço e linfonodo entre os dois grupos.

Mayrink e colaboradores (1996) administraram, em nove cães, três doses de *Leishmania braziliensis* fragmentadas associadas a BCG. Dez cães, utilizados como controles, foram injetados somente com BCG. Posteriormente, os cães foram injetados com formas promastigotas de *Leishmania chagasi/L. infantum* e a partir da resposta imune humoral e

linfoproliferativa específicas, os autores concluíram que os animais imunizados apresentaram proteção contra a infecção.

Lasri e colaboradores (1999) injetaram formas promastigotas de *L. major* autoclavadas (ALM) associadas à saponina ou a BCG. Os dois grupos de animais produziram anticorpos específicos, porém apenas o último exibiu anticorpos reativos a uma proteína de *Leishmania* de 85 kDa e desenvolveu resposta linfoproliferativa específica.

Uma fração de glicoproteínas purificadas a partir de *L. donovani*, com afinidade para fucose e manose (denominada Fucose Manose Ligante – FML), foi avaliada em diversos modelos animais, incluindo o camundongo, hamster e cão. A administração dessa fração glicoproteica em animais promoveu proteção parcial contra a infecção experimental com *L. chagasi/L. infantum*. Além disso, em um experimento realizado com 117 cães soronegativos de uma área endêmica para LV, 59 e 58 animais foram administrados com placebo ou FML associada à saponina, respectivamente. A análise realizada, dois anos após a imunização, revelou proteção parcial contra a infecção nos animais injetados com FML (Santos *et al.* 1999, Da Silva *et al.* 2001, Borja-Cabrera *et al.* 2002, Santos *et al.* 2002). Esses achados são promissores e estudos duplo-cegos multicêntricos são aguardados para confirmação os resultados obtidos.

Em 2003, Ramiro e colaboradores imunizaram cães com DNA (DNA-LACK) plasmideal, realizaram um reforço com vírus recombinante vaccinia codificando a proteína LACK *L. chagasi/L. infantum* (rVV-LACK) e, em seguida, injetaram os animais com 10^8 promastigotas de *L. chagasi/L. infantum*, por via intravenosa, e os avaliaram por 17 meses. Quatro de cinco animais imunizados com DNA-LACK e rVV-LACK permaneceram assintomáticos, não produziram de anticorpos específicos e tampouco exibiram parasitismo no baço e no fígado. Adicionalmente, linfócitos do sangue periférico desses apresentaram resposta proliferativa *in vitro* específica. Todos os cinco animais submetidos a infecção desenvolveram manifestações clínicas, anticorpos específicos, parasitismo esplênico e hepático e falharam em apresentar resposta linfoproliferativa, frente ao estímulo com LACK.

Saldarriaga e colaboradores (2006) injetaram cães com uma mistura de DNA plasmideal codificando 10 diferentes polipeptídeos *Leishmania* (histonas H1, H2A, H2B, H3, H4, além de LACK, PSA-2, TSA, STI1 and ARP-1). Os animais imunizados apresentaram resposta linfoproliferativa e hipersensibilidade cutânea tardia específica, bem como tendência a expressar mRNA de IFN- γ , após estimulação específica *in vitro*. Após a inoculação experimental de *Leishmania chagasi/L. infantum*, esses animais revelaram menor carga parasitária no linfonodo drenante em comparação com o grupo controle.

2.7. A Interleucina 12 como Adjuvante Vacinal

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que promove a diferenciação de células T_H1 e a produção de IFN- γ por linfócitos T e NK (Hsieh *et al.* 1993, Manetti *et al.* 1993, Ma *et al.* 1995, Trichieri & Scott 1995, Bliss *et al.* 1996). Devido às atividades biológicas de IL-12, essa citocina é uma molécula candidata a componente de formulações vacinais contra leishmaniose visceral.

Camundongos BALB/c desenvolvem uma doença grave quando experimentalmente infectados com *L. major*. Afonso e colaboradores (1994) injetaram camundongos BALB/c com a fração solúvel de extrato bruto de antígenos *L. major* (SLA), em associação a IL-12, e observaram que os animais, após a imunização, apresentam uma reposta imune celular específica do tipo T_H1 (alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4) e exibem resistência à infecção. Adicionalmente, camundongos BALB/c injetados antígeno LACK e IL-12 (na forma de proteína ou plasmídeo) também apresentaram proteção contra a infecção com *L. major* (Stobie *et al.* 2000).

Camundongos BALB/c e C57Bl/6 imunizados com um hapteno [2,4,6-trinitrofenil (TNP)] conjugado a uma proteína carreadora [“keyhole limpet hemocyanin” (KLH)] em associação a IL-12 murina recombinante, desenvolvem resposta a TNP-KLH do tipo T_H1/T_H2 , enquanto que animais injetados exclusivamente com TNP-KLH revelam resposta imune do tipo T_H2 (Bliss *et al.* 1996).

2.8. Efeitos da Administração de Interleucina 12 *in vivo*

Tare e colaboradores (1995) administraram de 10 ng a 1 μ g de IL-12 recombinante por animal, diariamente, durante sete dias, em camundongos da linhagem C57Bl/6 com 8 a 12 semanas de idade. Esses autores descreveram uma supressão da hematopoiese na medula óssea, anemia, leucopenia e trombocitopenia, dose e tempo-dependente. Os autores observaram também esplenomegalia devida ao aumento da polpa vermelha e de hematopoiese extramedular, sendo essa última representada por células precursoras das linhagens eritrocíticas, mielocíticas e megacariocíticas.

Jackson e colaboradores (1995) trataram camundongos da linhagem BALB/c com 1 μ g de IL-12 recombinante por animal, durante três ou sete dias consecutivos. Nesses animais, os autores notaram redução no número de leucócitos totais e linfócitos, aumento de

granulócitos e monócitos periféricos no sangue periférico. Paralelamente, foram observadas hipoplasia da medula óssea e diminuição das unidades formadoras de colônia granulocítica-macrofágica (UFC-GM) bem como hiperplasia esplênica e aumento de UFC-GM, sugerindo um efeito mobilizador da IL-12 sobre as células progenitoras.

Anemia, linfopenia, neutropenia, reticulocitose, esplenomegalia e aumento da celularidade esplênica, representada por aumento da hematopoiese, das células NK e dos macrófagos, foram encontradas após injeção de 1 µg / dose, durante quatro dias consecutivos, em camundongos 129 Sv/EV (Eng *et al.* 1995). Esses mesmos autores encontraram redução na hematopoiese medular e no número de células na medula óssea, com diminuição das células mielóides, eritróides, linfóides e de seus progenitores.

Para determinar os efeitos causados diretamente e os efeitos causados indiretamente, dependentes de IFN- γ , Eng e colaboradores (1995) administraram 1 µg de IL-12 recombinante, durante quatro a sete dias consecutivos, em camundongos selvagens da linhagem 129 Sv/Sv ou camundongos deficientes na expressão de receptor de IFN- γ (IFN- γ -R-/-). Em camundongos IFN- γ -R-/- tratados com IL-12, não ocorreu alteração de celularidade no sangue periférico, exceto por um aumento na concentração de neutrófilos de cerca de 1,8 vezes. Adicionalmente, tampouco foram observadas alterações na medula óssea. Em contraste, os 129 Sv/Sv selvagens tratados com IL-12 apresentaram anemia discreta, reticulocitose, linfopenia e aumento de 3,3 vezes na concentração de neutrófilos, bem como redução da celularidade da medula óssea. Esses dados sugerem que o aumento da concentração de células no sangue periférico e redução de células progenitoras na medula óssea dependem da ação de IFN- γ .

A partir de estudos experimentais, alguns autores sugerem que a administração de plasmídeo codificando IL-12 seria uma alternativa para obterem-se os efeitos biológicos sem a toxicidade associada à injeção das quantidades da proteína utilizadas para obtenção de efeitos terapêuticos (Watanabe *et al.* 1999, Lui *et al.* 2001, Shi *et al.* 2002, Weber *et al.* 2004).

2.9. A Administração de Plasmídeo por Eletroporação

A descoberta que a administração de plasmídeo com insertos poderia resultar na produção de proteínas codificadas pelos insertos *in vivo* gerou uma grande esperança para a terapia gênica. No entanto, embora a administração de plasmídeo em camundongos resulte frequentemente na indução de efeitos biológicos, a administração em animais de maior porte,

em geral, não acarreta mudanças detectáveis. Por isso, vários pesquisadores vêm trabalhando no desenvolvimento de metodologias para tornar a administração de plasmídeo mais efetiva.

Recentemente, vários autores demonstraram que aplicação de pulsos elétricos no local da injeção de plasmídeo com insertos favorece a entrada dessas moléculas nas células e pode resultar em um aumento considerável da produção da proteína codificada pelos insertos (Dower *et al.* 1988, Taketo *et al.* 1988, Fong *et al.* 1989, Melkonyan *et al.* 1996, Somiari *et al.* 2000, Draghia-Akli *et al.* 2003).

A aplicação de campos elétricos resulta na formação temporária de poros na membrana celular permitindo a passagem de macromoléculas para o interior da célula. Os poros são formados por alterações na membrana citoplasmática, dentre elas a formação de poros hidrofílicos invertidos (Somiari *et al.* 2000).

Finalmente, vários estudos foram realizados e parâmetros apropriados para o sucesso da administração de plasmídeos por eletroporação foram definidos, tanto em camundongos como em outras espécies animais, como por exemplo, em cão, incluindo a voltagem, amperagem, número de pulsos e duração de pulsos elétricos (Lucas e Heller 2001, Fewell *et al.* 2001, Grønevik *et al.* 2003, Draghia-Akli *et al.* 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir no desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imunogenicidade de dois antígenos recombinantes da forma amastigota de *Leishmania chagasi/L. infantum* no cão.
- Avaliar possíveis modificações da resposta imune aos antígenos recombinantes de *L. chagasi/L. infantum* pela injeção concomitante de IL-12, na forma de plasmídeo, no cão.
- Avaliar os efeitos da administração de IL-12, na forma de plasmídeo, por eletroporação, em camundongo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Avaliação da Resposta Imune Específica de Cães Injetados com Antígenos Recombinantes de *Leishmania chagasi/L. infantum* e Plasmídeo Codificando IL-12 canina

Para avaliação do potencial de moléculas candidatas a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina (LVC), cães foram injetados com dois antígenos recombinantes da forma amastigota de *Leishmania chagasi/L. infantum*, denominados Lc9 e Lc13, em associação com saponina e IL-12 canina recombinante de cadeia única, administrada na forma de plasmídeo. Depois disso, foi realizada a avaliação da resposta imune humoral específica, pela mensuração de anticorpos da classe IgG reativos a Lc9, Lc13 e a extrato bruto de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, usando-se ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA). Além disso, foi realizada a avaliação da resposta imune celular específica, pela mensuração de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (CMNSP), e a avaliação da produção de IFN- γ por CMNSP, após estímulo *in vitro* com Lc9, Lc13 e extrato bruto de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, através da mensuração da incorporação de timidina radioativa por células e de ELISA de captura em sobrenadante de cultura, respectivamente. Ver Anexo 3.

4.1.1. Obtenção de antígenos de *Leishmania chagasi/L. infantum*

Antígenos recombinantes de formas amastigotas de *L. chagasi/L. infantum*, denominados Lc9 e Lc13, foram obtidos para serem injetados em cães visando a indução e a avaliação de resposta imune específica. Além disso, extrato bruto de antígenos de formas promastigotas *L. chagasi/L. infantum* também foram obtidos para serem usados em ensaios imunológicos com a finalidade de avaliar a resposta imune específica em cães.

4.1.1.1. Antígenos Recombinantes de Formas Amastigotas

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, dois antígenos recombinantes denominados Lc9 e Lc13 foram selecionados (Teixeira *et al.* 2007) a partir de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) de formas amastigotas de *L. chagasi/L. infantum* confeccionada em fago lambda, usando-se reagentes da Stratagene Corporation (Stratagene Corporation, La Jolla, EUA; Teixeira *et al.* 2007). Esses dois antígenos foram selecionados usando-se uma mistura de soro de quatro cães naturalmente infectados por *L. chagasi/L. infantum* e que exibiam resposta imune celular específica ao protozoário (Santos, WLC *et al.*, dados não publicados). Após a seleção dos dois clones de fago lambda, foram geradas construções plasmídeais, contendo insertos de cDNA codificando Lc9 e Lc13, denominadas pBK-CMV-Lc9 e pBK-CMV-Lc13, respectivamente. Os genes que codificam Lc9 e Lc13 foram identificados, através de uma colaboração com o Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ, Recife, PE), pela determinação das seqüências de DNA das extremidades 5' e 3' dos insertos e comparação dessas com seqüências de DNA do genoma de *L. infantum* depositadas no banco de dados do Instituto Sanger, Reino Unido (<http://www.genedb.org/genedb/linfantum/>).

Para facilitar a purificação da proteína Lc9, o inserto da construção pBK-CMV-Lc9 foi subclonado em plasmídeo pRSET, que acrescenta uma cauda de seis histidinas na extremidade amina da cadeia polipeptídica recombinante (Teixeira *et al.* 2007).

Os antígenos recombinantes foram produzidos em *Escherichia coli* das cepas BL21(DE3)pLysS e TOP10F', transformadas pelas construções plasmídeais pRSET-Lc9 e pBK-CMV-Lc13, respectivamente (BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lc9 e TOP10F'-pBK-CMV-Lc13), seguindo-se as recomendações da Invitrogen.

Resumidamente, colônias isoladas de BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lc9 e TOP10F'-pBK-CMV-Lc13 foram usadas para inocular até 150 mL de caldo de cultura Luria-Bertani [caldo LB: 1% de bacto-triptona (m/v), 0,5% de extrato de levedura (m/v), 1% de cloreto de sódio (m/v), pH 7.0] contendo antibióticos. Para o cultivo de BL21(DE3)pLysS-pRSET-Lc9 e TOP10F'-pBK-CMV-Lc13 foram usados antibióticos nas seguintes concentrações finais: 50 µg/mL de ampicilina, 35 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de kanamicina, respectivamente. Após incubação por cerca de 16 h a 37° C, sob agitação constante de 250 rpm em uma incubadora orbital (Orbit Environ Shaker), as suspensões bacterianas resultantes foram usadas para inocular volumes maiores de meio LB. Incubação de volumes maiores de cultura foi realizada a 37° C, sob agitação constante de 250 rpm, até a densidade óptica medida de cada cultura, realizada a 600 nm, alcançar cerca de 0,6. A partir daí, indução de expressão de proteína recombinante foi realizada pela adição de isopropil-thio-β-D-

galactosídio (IPTG) para atingir a concentração final de 0,250 mM. Foi realizada incubação, conforme descrito previamente, por 5 h. As suspensões bacterianas foram submetidas à centrifugação a 4000 \times g por 20 minutos e os sedimentos foram armazenados a -20° C até o momento do uso.

A purificação de Lc9 foi realizada por cromatografia de afinidade, usando-se colunas com resina de Sepharose carregada com níquel (Sepharose Chelating Fast Flow), preparada conforme instruções do fabricante. Resumidamente, sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise (100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de base Tris e 8 M de uréia, pH 8,0), submetido à agitação por 1 hora e a suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 \times g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado a uma coluna de Sepharose carregada com níquel. Após lavagem da resina com tampão 100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de base Tris, 8 M de uréia (pH 8,0) e 20 mM de imidazol, a coluna foi eluída com tampão 100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de base Tris, 8 M de uréia (pH 8,0) e 500 mM de imidazol. O material eluído da coluna foi submetido à diálise, usando-se saco de diálise capaz de reter moléculas com peso molecular superior a 8.000 kDa, contra salina tamponada com fosfato (PBS), pH7,2. Em seguida o dialisado foi centrifugado a 1200 \times g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante concentrado por ultrafiltração no Amicon para 800 μg / mL, com compressão de 55 psi (3,7 ATM) de nitrogênio gasoso. A mensuração da concentração de proteínas foi realizada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e pelo método de Bradford, com uma curva referência de BSA. Aliquotas de 800 μg / mL de Lc9 foram armazenadas a -20° C.

A purificação de Lc13 foi realizada a partir de corpúsculos de inclusão através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com duodecil sulfato de sódio (SDS). Para a obtenção de corpúsculos de inclusão, sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise, pH 8,0, contendo 20mM Na_2HPO_4 , 500mM NaCl e 10mM imidazol e incubado por 20 minutos sobre gelo. Para cada grama de sedimento bacteriano foram adicionados quatro miligramas de ácido deoxicólico, para auxílio na lise bacteriana. Seguiu-se incubação a 37°C , durante 15 minutos, em banho-maria, e a fragmentação do DNA genômico foi realizada por sonicação sobre o gelo usando-se o aparelho ultrasonicador (Sonifier Cell Disruptor). A sonicação foi realizada com quatro pulsos de 300 Watts, cada pulso com duração de 30 segundos e intervalo de 10 segundos entre cada dois pulsos consecutivos. A suspensão foi centrifugada a 17.000 \times g, 4°C , por 15 minutos, e o sedimento, depois de três lavagens com tampão de lise, foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Lc13 foi separado de outras proteínas presentes nos corpúsculos de inclusão utilizando-se um aparelho Prep Cell modelo 491, seguindo-se as recomendações do

fabricante. Esse aparelho permite a separação de proteínas com pesos moleculares diferentes entre si, por SDS-PAGE. Após a separação, as proteínas são obtidas em frações solúveis em tampão base Tris a 0,025 M, glicina a 0,192 M (pH 9,3) e SDS a 0,1%. Resumidamente, géis de poliacrilamida em forma de cilindro oco foram preparados, usando-se o sistema descontínuo de tampão, essencialmente, conforme descrito Laemmli (1970). Os géis foram preparados entre dois cilindros. Um cilindro externo oco, comprimento de 12 cm e diâmetro interno de 3,7 cm, e um cilindro interno, com diâmetro externo de 1,9 cm. Usando-se esse sistema, cilindros ocos foram preparados com gel de separação de cerca de 10 cm de altura e gel de empacotamento com cerca de 2 cm de altura.

Gel de separação foi elaborado com acrilamida-bis-acrilamida a 8,5 % (m/v). Para isso, foram usados acrilamida a 8,27 % (m/v) e bis-acrilamida a 0,23 % (m/v), tampão Tris-HCl 0,375 M (pH 8.8), SDS a 0,1% (m/v), persulfato de amônio a 0,1% (m/v) e *N,N,N',N'* tetrametileno-diamina (TEMED) a 0,006 % (v/v). Gel de empacotamento foi elaborado com acrilamida-bis-acrilamida a 5 % (m/v). Para isso, foram usadas acrilamida a 4,87 % (m/v) e bis-acrilamida a 0,13 % (m/v), tampão Tris/HCl a 0,125 M (pH 6.8), SDS a 0,1% (m/v), persulfato de amônio a 0,1 % (m/v) e TEMED a 0,01 % (v/v).

As amostras foram preparadas com tampão Tris/HCl a 0,0625 M, pH 6.8, SDS a 2 % (m/v), glicerol a 10 % (v/v), 2-β-mercaptoetanol 5 % (v/v) e azul de bromofenol a 0,01 % (m/v) e fervidas por três minutos em banho-maria. As corridas foram realizadas usando-se tampão de base Tris a 0,025 M, glicina a 0,192 M e SDS a 0,1%, e com corrente constante entre 10 e 15 mAp durante a noite e depois 70 mAp até o final da corrida. Durante a corrida, uma câmara localizada abaixo do gel de separação, denominada câmara de eluição, foi continuamente alimentada com tampão de eluição (base Tris a 0,025 M, glicina a 0,192 M e SDS a 0,1%). Assim que todo azul de bromofenol, presente no tampão da amostra, saiu do gel da câmara de eluição, foram coletadas cerca de 120 frações, cada uma com 2 mL. Após análise das frações protéicas por SDS-PAGE, conforme método de Laemmli (1970), as frações contendo Lc13 foram reunidas e, em seguida, SDS foi removido através de eletrodialise, usando-se um método semelhante ao descrito por Tuszynski e Warren (1975). Resumidamente, as frações de Lc13 reunidas foram colocadas em um saco de diálise de 25 mm de diâmetro capaz de reter proteína com peso molecular superior a 8.000 Daltons. O saco de diálise foi colocado em uma cuba de eletroforese de acrílico, de construção caseira (Pinheiro, N.P.F.Jr. e colaboradores), contendo tampão fosfato de sódio a 0,02 M (pH 6,8) e uma corrente de 40 Volts foi aplicada por 24 horas. Depois foi realizada inversão de corrente por 1 minuto. Depois desse período, o conteúdo do saco foi submetido à diálise contra PBS,

pH 7,2. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, diluindo-se as amostras com uréia a 4 M. Alíquotas com 2,2 mg / mL foram armazenadas a -20 C. Ver Anexo 1.

4.1.1.2. Extrato Bruto de Formas Promastigotas

Extrato bruto de antígenos de formas promastigotas de *Leishmania* de cultura foram obtidos para uso em ensaio de imunoenzimático em fase sólida para avaliação da produção de anticorpos específicos e para avaliação de resposta linfoproliferativa e indução de produção de IFN- γ após estimulação específica em cães.

A cepa de *L. chagasi/L. infantum* utilizada para a preparação de extrato bruto de antígenos foi a MHOM/BR2000/Merivaldo2. Essa cepa foi isolada, inicialmente, através de punção esplênica de um paciente com quadro clínico de LV oriundo de Jequié-Bahia. Essa cepa de *Leishmania* vem sendo mantida em nosso laboratório em alíquotas, armazenadas em nitrogênio líquido, geradas após cultivo em meio Schneiders e 20 % (v/v) de soro bovino fetal (SBF) com complemento inativado ou de passagens sucessivas em hamsters.

Para obtenção de formas promastigotas de *L. chagasi/L. infantum*, um fragmento de fígado de hamster infectado foi macerado e incubado em meio de cultura Schneiders, pH 7,2, suplementado com 20% de SBF, inativado a temperatura de 24° C. Uma amostra, com formas promastigotas geradas, foi usada na realização de um processo passagens sucessivas para expansão de *Leishmania*. Parasitos, em fase estacionária, de até sete passagens, foram centrifugados a 500 x g, a 4°C, por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados três vezes com PBS (NaCl a 137 mM, KCl a 2,68 mM, Na₂HPO₄ a 9,58 mM e 1,47 mM NaK₂PO₄), pH 7,2. O sedimento obtido após a última lavagem foi ressuspenso com 10 mL de PBS, pH 7,2. A suspensão foi submetida à sonicação com cinco pulsos de 40 Hz, sob gelo. Os pulsos foram realizados cada um com 45 segundos de duração, com intervalo de 60 segundos entre cada dois pulsos consecutivos, usando-se o aparelho Ultrasonic Processor, sendo a amostra mantida no gelo nos intervalos. Depois desse processo, a concentração proteínas foi determinada através do método de Bradford (1976). Alíquotas foram preparadas com 9,75 mg / mL de proteína. Algumas dessas alíquotas foram submetidas à irradiação no irradiador modelo IBL 437C, com 7200 rad por aproximadamente 28 minutos, para uso em ensaio de linfoproliferação, antes de serem armazenados à -20°C até o momento do uso.

4.1.2. Obtenção de Plasmídeo Codificando IL-12 de Cão

Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, uma construção plasmideal contendo um inserto codificando IL-12 recombinante canina, na forma de cadeia única, foi confeccionada (pcDNA3.1-scca-IL-12, Santos *et al.* 2004). No presente trabalho, uma colônia de *E. coli* da linhagem TOP10F' transformada com a construção pcDNA3.1-sccazeo-IL-12 foi usada para inocular de 5 a 10 mL de caldo LB com ampicilina na concentração de 50 mg / mL. A suspensão bacteriana foi incubada, por oito horas, a 37° C, sob agitação constante de cerca de 300 rpm. Após esse período, um volume de cultura foi usado para inocular cerca de 2.500 mL de caldo LB com ampicilina, para alcançar uma diluição de 1:1000, que foram incubados por cerca de 12 a 16 horas, a 37° C, sob agitação constante de 300 rpm. O sedimento bacteriano foi obtido pela centrifugação a 6.000 x g a 4° C, por 15 minutos, sendo, depois, armazenado a -20° C até o momento do uso. A partir do sedimento bacteriano, o plasmídeo foi purificado usando-se colunas cromatográficas de troca iônica, filtro e reagentes da Qiagen, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 125 mL de tampão P1 a 4° C (Tris/HCl a 50 mM pH 8,0, EDTA a 10 mM e RNase a 100 µg / mL), em seguida, 125 mL de P2 [NaOH a 200 mM e SDS a 1 % (m/v)] foram acrescentados, para promover lise das bactérias além de desnaturação e precipitação de DNA. A suspensão de lisado bacteriano foi incubada a temperatura ambiente (22 – 24° C) por 5 minutos. Um volume de 125 mL de P3 (acetato de potássio a 3 M, pH 5,5) a 4° C foi adicionado à suspensão de lisado bacteriano para causar renaturação e solubilização das moléculas do plasmídeo. A mistura resultante foi incubada sob gelo, por 30 minutos, sendo depois centrifugada a 20.000 x g e a 4° C, por 30 minutos. Sobrenadante contendo plasmídeo foi aplicado em filtro Qiagen, ou filtrado em tecido de algodão, e depois aplicado em uma coluna de troca iônica previamente equilibrada com 75 mL de tampão QBT [NaCl a 750 mM, ácido morfolínico-fenil-sulfônico (MOPS) a 50 mM, pH 7,0, isopropanol a 15 % (v/v) e Triton X-100 a 0,15 % (v/v)]. A coluna cromatográfica foi lavada com 600 mL de tampão QC [NaCl a 1 M, MOPS a 50 mM, pH 7,0 e isopropanol a 15 % (v/v)]. Um volume de 100 mL de tampão QF [NaCl a 1,25 M, Tris/HCl a 50 mM, pH 8,5 e isopropanol a 15 % (v/v)] foi usado para eluição de DNA plasmideal da coluna e, para precipitação do DNA, foi usado 52,5 mL de isopropanol P.A., seguido de centrifugação a 15.000 x g a 4°C por 30 minutos. O pellet contendo o DNA foi lavado com 10 mL de etanol 70% e depois centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos. O material permaneceu por 20

minutos em temperatura ambiente, para permitir a evaporação da água do pellet, sendo o DNA ressuspensão em quatro mililitros de solução salina estéril.

4.1.3. Avaliação da Resposta Imune Humoral

4.1.3.1. ELISA para Mensuração de Anticorpos Reativos a Extrato Bruto de Formas Promastigotas

O ELISA para mensuração da IgG anti-*Leishmania* foi realizado de acordo com Paranhos-Silva e colaboradores (1996) utilizando placas de 96 poços. Resumidamente, poços da placa de microtitulação foram sensibilizados com 100 µL de extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* na concentração de 10 µg / mL durante cerca de 14 horas à 4°C, em tampão de sensibilização carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M, pH 9.6, na concentração de 1 µg por poço. Após três lavagens com 200 µL por poço de PBS contendo 0,05 % de Tween 20, os sítios capazes de reagirem inespecificamente com proteínas foram bloqueados durante 30 minutos à 37°C com 150 µL por poço de PBS / leite desnatado 10%, seguida de nova lavagem (3X) com 200 µL por poço de PBS / Tween 20 0,05%. Cem microlitros das amostras séricas dos cães, diluídas 1:400 em PBS – Tween 20 a 0,05% (v/v) – leite desnatado a 10% (m/v), PBS-TL, foram aplicadas nos poços e incubadas durante 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após lavagem, como já descrito, 100 µL por poço da anti-IgG de cão conjugada à peroxidase, produzida em caprino, diluída 1:1000 em PBS-TL, foi incubada por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente, seguida de lavagem. A reação foi revelada pela adição de substrato com 2,5 mg de 3,3',5,5' tetrametil-benzidina (TMB) em 250 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), tampão acetato de sódio 0,5M, ácido cítrico 0,5M e 0,1% de peróxido de hidrogênio 30V. Após incubação por 45 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL por poço de ácido sulfúrico 4 M e a leitura foi realizada com filtro de 450 nm no espectrofotômetro modelo Microplate Reader EL311. Como controles positivos, foram usados soro de um animal naturalmente infectado e um pool de soro de cães naturalmente infectados com altos títulos de anticorpos IgG reativos ao extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*. Como controles negativos, foram utilizados quatro soros de cães sorológica e parasitologicamente negativos residentes em Rio Grande do Sul, região livre de LV. O “cut off” foi calculado pela média dos controles

negativos somados a 3 desvios padrões; valores acima desse “cut off” foram considerados positivos.

4.1.3.2. ELISA para Mensuração de Anticorpos Reativos a Antígenos Recombinantes de Formas Amastigotas (Lc9 e Lc13)

O ensaio imunoenzimático utilizado foi o ELISA, cujo protocolo foi descrito acima. Para sensibilização das placas de 96 poços, foram utilizados 0,4 e 0,5 µg por poço de Lc9 e Lc13, respectivamente, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato de sódio.

4.1.4. Avaliação da Resposta Imune Celular

4.1.4.1. Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMNSP) de Cão

A separação das CMNSP foi realizada utilizando-se gradiente Ficoll-Paque Plus, em condições estéreis, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, o sangue foi diluído 1:2 em solução salina e despejado lentamente sob o Ficoll-Paque Plus (1 parte do sangue diluído para 1,25 partes de Ficoll). Essa mistura foi centrifugada a $100 \times g$ durante 30 minutos, à 20°C. O anel de CMNSP formado foi cuidadosamente removido e transferido para um novo tubo contendo meio RPMI 1640 com 60 µg / mL gentamicina. Foram realizadas três lavagens, neste meio com antibiótico, a $100 \times g$ durante 10 minutos à 20°C. Após a primeira lavagem, foi realizada lise osmótica das hemácias com 400 µL de água apirogênica estéril durante 30 segundos. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de SBF, 1% L-glutamina 200 mM e 0,01% 2-mercaptoetanol 0,1M, denominado RPMI completo. Uma amostra de suspensão celular foi diluída a 1:5 em azul de tripan 0,4% e contadas em câmara de Neubauer. Depois disso, duas suspensões de células foram preparadas, em uma a concentração celular foi ajustada para 2×10^6 / mL e, na outra, para 10^7 / mL.

4.1.4.2. Ensaio para Avaliar a Resposta Linfoproliferativa

CMNSP proveniente de cada cão foram distribuídas em poços de duas placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato. Um volume de 100 µL de suspensão com 2×10^5 células foi colocado em poços de cada uma das duas placas. Em uma das placas, foram acrescentados 100 µL / poço de RPMI completo ou 100 µL / poço de concanavalina A (Con A) a 4 µL / mL a cada um de três poços contendo células. Na outra placa, foram adicionados 100 µL / poço de RPMI completo ou de antígenos recombinantes Lc9 ou Lc13, nas concentrações de 1 ou 5 µg / mL ou, ainda, extrato bruto *L. chagasi/L. infantum*, na concentração de 20 µg / mL, diluídos em meio RPMI completo, em cada um de três poços contendo células. As placas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% CO₂ por 3 ou 5 dias, para ensaios com Con A e antígenos, respectivamente. Depois disso, um volume de 30 µL de RPMI completo com 1 µCi de timidina tritiada foi acrescentado a cada poço e as placas foram incubadas por 18 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células foram coletadas em filtro de fibra de vidro, usando-se um coletor manual. A leitura radiativa foi realizada em um contador beta direto modelo Matrix 9600. Como controles positivos, foram utilizadas CMNSP de quatro cães experimentalmente infectados com *L. chagasi/L. infantum*, sorologicamente reativos a extrato total e parasitologicamente positivos, observado por punção esplênica e cultivo *in vitro*.

4.1.4.3. Avaliação da Produção de Interferon Gama

Para a avaliação de produção de IFN-γ, um volume de 1000 mL de suspensão de células de cada cão, com 10^7 células, foi colocado em cada um de três poços de placas de cultura de 6 poços. Em um poço foram acrescentados 1.000 mL de RPMI completo ou 1.000 mL de Con A a 20 µg / mL ou extrato bruto de *L. chagasi/L. infantum* a 40 µg / mL, diluídos em RPMI completo. As placas foram incubadas à 37°C com 5% CO₂ por 48 horas, quando então o sobrenadante de cada poço foi separadamente coletado, centrifugado a 12.000 x g por um minuto e, depois, armazenado a - 20° C até o momento do uso. Três dos quatro cães experimentalmente infectados com *L. chagasi/L. infantum* foram utilizados como controles positivos, pois em um dos animais foi recuperada quantidade insuficiente de células para a realização desse ensaio.

4.1.4.4. ELISA para Mensuração de Interferon Gama (IFN- γ)

A mensuração da concentração de IFN- γ canino em sobrenadantes de CMNSP foi realizada por ELISA. Para isso, foi usado um anticorpo monoclonal específico produzido em camundongo para a captura e anticorpos policlonais específicos, produzidos em cabra, conjugados a biotina, para a detecção, conforme instruções do fabricante. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços (“High Binding”) foram sensibilizadas com 100 μ L / poço de anticorpo de captura, na concentração de 2 μ g / mL, durante 16 h, à temperatura ambiente (25°C) em câmara úmida. Após lavagem dos poços, três vezes, com 350 μ L de PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de tween 20, foi realizado bloqueio com 300 μ L / poço de PBS (pH 7,4), 1% albumina de soro bovino (BSA, m/v), 5% de sacarose (m/v), 0,05% de azida sódica (m/v), a temperatura ambiente, por 1 hora. Foi realizada lavagem dos poços das placas, conforme descrito previamente. Para elaboração da curva de calibração, a cada um de dois poços foram acrescentados 100 μ L de IFN- γ canino recombinante na concentração de 32 ng / mL e, a partir daí, 100 μ L de diluições duplas seriadas até 31,25 pg / mL. Para avaliação de sobrenadante de cultura de CMNSP, amostras de sobrenadante de células estimuladas com Con A foram diluídas 1:10, em PBS (pH 7,4) com 1% de BSA (m/v), antes de serem testadas; as demais amostras foram usadas tal como coletadas. Todas as amostras de sobrenadante foram avaliadas em duplicatas com 100 μ L / poço. Após a incubação a temperatura ambiente, por 2 horas, os poços foram lavados. Depois disso, 100 μ L de anticorpo de detecção a 100 ng / mL foram acrescentados a cada poço. Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente, por 2 horas. Foi realizada lavagem dos poços das placas. Posteriormente, 100 μ L de estreptavidina-peroxidase diluída de 1:200 foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a lavagem dos poços da placa, 100 μ L substrato de peroxidase {9 mL de tampão fosfato-citrato ([Na₂HPO₄ a 51,4 mM e HOC(COOH)(CH₂COOH)₂ a 24,3 mM], pH 5,0), 1 mL de tetrametilbenzidina (TMB) a 1 mg / mL e 2 μ L de H₂O₂ 30%}, foram acrescentados em cada poço. Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, sob proteção da luz, a reação foi interrompida pelo acréscimo de 50 μ L / poço de H₂SO₄ a 1 M. A leitura da densidade óptica a 450 nm foi realizada em espectrofotômetro (Emax Precision Microplate Reader). A concentração de IFN- γ canino nas amostras avaliadas foi determinada usando-se a média aritmética dos valores de densidade óptica das duplicatas com o programa Softmax 3.0, corrigidas pelo fator de diluição (1:10), quando apropriado.

4.1.5. Avaliação Parasitológica

Visando reduzir a possibilidade de uso de cães naturalmente infectados por *L. chagasi/L. infantum* no experimento aqui descrito, cada cão foi submetido à punção aspirativa esplênica seguida de cultura de material aspirado em meio de cultura apropriado para transformação de formas amastigotas em promastigotas e proliferação das últimas. A punção esplênica foi realizada, essencialmente, conforme método descrito por Barrouin-Melo *et al.* (2006). Resumidamente, cada cão foi injetado com 0,044 mg / Kg de atropina por via subcutânea, 2 mg / Kg de xilazina e, em seguida, 11 mg / Kg de quetamina por via muscular. Depois disso, cada animal foi colocado em decúbito lateral direito, foi realizada antisepsia, e foi introduzida uma agulha de 30 x 0.8 mm, acoplada a uma seringa de 20 mL, imediatamente abaixo da última costela, na região do flanco esquerdo até penetrar alguns centímetros no baço. A partir daí, foi aplicada pressão negativa na seringa e, com isso, foram obtidos cerca de 0,2 a 1 mL de material aspirado. O material aspirado foi cultivado em meio de cultura bifásico com 1,5 mL de meio sólido agar-sangue e 2 mL de meio Schneiders suplementado com 20 % de SBF. Amostras das culturas foram coletadas semanalmente e examinadas, por durante oito semanas, ao microscópio para a detecção de formas promastigotas de *Leishmania*.

4.1.6. Animais

Cães mestiços adultos com idade variando de 4 a 9 anos, de ambos os sexos, foram obtidos nos Centro de Controle de Zoonoses dos municípios de Salvador, Lauro de Freitas e Dias D'Ávila - Bahia. Os animais foram alojados nos canis experimentais do Laboratório Central do Estado da Bahia (LACEN) e do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) e manipulados conforme as Boas Práticas de Experimentação Animal (Olfert *et al.* 1993).

Visando eliminação de possíveis exo e endoparasitoses pré-existentes, cerca de três meses antes do início do experimento, os cães foram tratados com três doses de 5 mg / kg de praziquantel, 14,4 mg / kg de pirantel e 15 mg / kg de febantel, com intervalo de sete dias entre doses consecutivas, e com amitraz a 12,5%, na forma de banhos com duração e intervalos variados, determinados de acordo com avaliação médico veterinária.

Os animais foram imunizados para prevenção contra leptospirose causada por duas cepas, cinomose, adenovirose, virose causada por parainfluenza, parvovirose, hepatite viral,

coronavirose (vacina óctupla), conforme recomendação do fabricante, e observados por pelo menos 40 dias antes do início do experimento (Anexo 3).

Os cães machos foram submetidos à orquiepididectomia para facilitar o manuseio e diminuir o estresse resultante da agressividade nos períodos de cio das fêmeas (http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/cao/cao_03.htm) cerca de 190 dias antes do início do experimento (Anexo 3).

Inicialmente, cada animal foi submetido à avaliação imunológica (ELISA com extrato total de antígenos de *Leishmania*, ver item 4.1.3.1) e parasitológica (punção aspirativa do baço seguida de cultura para detecção de *Leishmania*, ver item 4.1.5) para reduzir a possibilidade de uso de animal naturalmente infectado por *L. chagasi/L. infantum* no experimento aqui descrito (Anexo 3). Foram selecionados para uso, somente os animais com resultados negativos nos dois ensaios mencionados acima.

Os animais foram distribuídos em três grupos denominados: G1, G2 e G3. Os grupos foram compostos da seguinte maneira: a) G1: um macho e duas fêmeas, b) G2 : um macho e três fêmeas, e c) G3: um macho e duas fêmeas.

Além disso, um grupo de quatro cães adultos mestiços, dois machos e duas fêmeas, submetidos à injeção subcutânea, com intervalos de três a quatro semanas entre duas injeções consecutivas, com extrato bruto de *L. chagasi/L. infantum* correspondente 1×10^8 formas promastigotas em adjuvante de Freund, completo na primeira dose e incompleto na segunda dose, e com 1×10^8 formas promastigotas de cultura vivas na fase estacionária de multiplicação, foram usados como controle positivo para ensaios de linfoproliferação e produção de IFN- γ .

4.1.7. Imunização

Os animais foram injetados por via subcutânea, na região do músculo glúteo médio do membro posterior direito, e no linfonodo poplíteo ipsi-lateral nos dias 0, 21, 42 e 170 do experimento. Nesses dias os animais foram injetados com: 1 mg de saponina em 1 mL de salina por via subcutânea e com 0,5 mL de salina diretamente no linfonodo (G1, grupo controle negativo), 200 μ g de Lc9, 200 μ g de Lc13 e 1 mg saponina em 1 mL de salina por via subcutânea e com 0,5 mL de salina diretamente no linfonodo (G2) ou 200 μ g de Lc9, 200

µg de Lc13 e 1 mg saponina em 1 mL de salina por via subcutânea e com 800 µg de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 em 0,5 mL de salina diretamente no linfonodo (G3).

4.2. Efeitos da Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação Sobre Camundongo

4.2.1. Obtenção de Plasmídeo Codificando IL-12 Murina

Nos experimentos com camundongos, foi utilizado plasmídeo codificando cadeia única IL-12 murina (pcDNA3.1-scmu-IL-12), obtido pela subclonagem do inserto da construção pCI-neo-IL-12 (Noormohammadi *et al.* 2001), gentilmente cedido pela Dra. Emanuela Handman (Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália). A administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12, por via muscular e eletroporação, mostrou-se capaz de induzir a produção sistêmica, detectável no plasma, de IFN-γ em camundongos (Barrouin-Melo *et al.*, dados não publicados). Foi usado ainda como plasmídeo controle negativo pcDNA3.1.

Os plasmídeos foram purificados de cepa TOP10F' de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) transformadas, cultivadas por 16 horas em meio de cultura LB com 100 µg / mL de ampicilina, utilizando-se “kits” Qiagen (EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. No sedimento bacteriano, obtido por centrifugação, foi realizada a lise alcalina, sendo o sobrenadante aplicado em uma coluna de troca iônica. Após lavagem da coluna, o DNA plasmídeo foi eluído, precipitado, lavado com etanol e ressuspensão em salina. Após purificação, amostras dos plasmídeos foram submetidas à leitura de densidade óptica a 260 e a 280 nm, para determinação de concentração de DNA e pureza, e a fracionamento em gel de agarose a 1 %, para confirmação da estimativa de concentração e definição de pureza. As amostras foram armazenadas à – 20°C até o momento do uso.

4.2.2. Animais

Camundongos com 9 a 16 semanas de idade, de ambos os sexos, das linhagens C3H/HeJ e C57Bl/6 foram obtidos do biotério do CPqGM, Salvador, Brasil. Os animais foram mantidos no referido biotério sob adequadas condições de temperatura (21 ± 1 °C) e umidade

(50 – 60 %), com fornecimento de ração comercial BioBase (Base Química Prod. Quím. Ltda., Brasil) e água *ad libitum*.

4.2.3. Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação Sobre Camundongos

Inicialmente foram realizados dois experimentos pilotos, um experimento onde foram usados camundongos da linhagem C3H/Hej (Experimento piloto 1) e outro experimento foram usados camundongos da linhagem C57Bl/6 (Experimento piloto 2). Depois disso, foi realizado outro experimento onde foi usado número maior de camundongos (Experimento). Esses animais foram usados para a formação de grupos experimentais descritos abaixo. Como o procedimento experimental envolvia a injeção de salina ou de plasmídeo por via muscular seguida, na maioria das vezes, de eletroporação, sendo todos os animais submetidos à anestesia geral antes de cada injeção. As injeções de salina ou de plasmídeo foram realizadas no músculo quadríceps do membro posterior direito. O plasmídeos (pcDNA3.1 e pcDNA3.1-scmu-IL-12) foram solubilizados em salina e usados na concentração de 1 mg / mL.

Para a realização de anestesia geral, cada camundongo foi injetado com 100 mg de quetamina e 15 mg de xilazina por quilo de peso, administrada intraperitonealmente. A técnica eletroporativa foi realizada no sítio de injeção do plasmídeo, consistindo na aplicação de cinco pulsos elétricos de 100 Volts / cm, com duração de 20 milisegundos por pulso, e intervalo de 1 segundo entre cada dois pulsos consecutivos (Lucas e Heller 2001). O eletroporador foi projetado e construído pelo Dr. Yuri Pepe, Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia (Anexo 4).

Experimento Piloto 1

Usando-se 10 camundongos C3H/Hej fêmeas com 12 semanas de idade, foram formados dois grupos de cinco animais. Cada animal foi injetado duas vezes por via muscular, com intervalo de 48 h entre as injeções, com: a) 50 µg de pcDNA3.1 (grupo P1-pcDNA3.1 EL, grupo controle negativo) ou b) 50 µg de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (grupo P1-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL), e depois submetido à eletroporação. Infelizmente ocorreu a morte, durante o retorno anestésico, de dois animais do grupo controle negativo e um do grupo teste.

Experimento Piloto 2

Usando-se 6 camundongos C57Bl/6 machos com idade entre 9 e 10 semanas, foram formados dois grupos cada um deles com três animais. Cada animal foi injetado duas vezes por via muscular, com intervalo de 48 h entre as injeções, com: a) 50 µg de pcDNA3.1 (grupo P2-pcDNA3.1 EL), grupo controle negativo) ou b) 50 µg de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (grupo P2-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL), e depois submetido à eletroporação.

Experimento Real

Para esse experimento foram usados 11 camundongos C3H/Hej, de ambos os sexos e com idade de 10 a 16 semanas, e 29 camundongos C57Bl/6 machos com idade de 9 a 10 semanas. Foram formados dois grupos de animais da linhagem C3H/Hej e quatro grupos de animais da linhagem C57Bl/6. Ver Anexo 5.

Os grupos de camundongos C3H/Hej foram formados com seis (grupo E-pcDNA3.1 EL, grupo controle negativo) ou cinco animais (grupo E-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL). Cada animal foi injetado duas vezes por via muscular, com intervalo de 48 h entre as injeções, com: a) 50 µg de pcDNA3.1 ou b) 50 µg de pcDNA3.1-scmu-IL-12, e depois submetido à eletroporação.

Os grupos de camundongos C57Bl/6 foram formados com sete (grupo E-Salina EL), sete (grupo E-pcDNA3.1 EL), oito (grupo E-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL) e sete (grupo E-pcDNA3.1-scmu-IL-12) animais. Cada animal foi injetado duas vezes por via muscular, com intervalo de 48 h entre as injeções, com: a) 50 µL de salina (grupo E-Salina EL), b) 50 µg de pcDNA3.1 (grupo E-pcDNA3.1 EL), c) 50 µg de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (grupo E-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL) ou d) 50 µg de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (grupo E-pcDNA3.1-scmu-IL-12). Após cada injeção de plasmídeo os animais dos grupos E-Salina EL, E-pcDNA3.1 EL e E-pcDNA3.1-scmu-IL-12 EL foram submetidos à eletroporação.

4.2.4. Avaliação dos Animais Submetidos à Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 por Eletroporação sobre Camundongos

4.2.4.1. Coleta de Sangue

Amostras com cerca de 100 μL de sangue foram coletadas do plexo retro-orbitário de cada animal e derramados em tubos Eppendorf contendo anticoagulante EDTA (K_3) líquido, conforme descrição a seguir. Nos animais do experimento piloto 1 e no experimento real, as amostras foram obtidas oito e dez dias após a primeira injeção de plasmídeo. As coletas de sangue foram realizadas utilizando anestesia local à base de cloridrato de proximetacaína 0,5% .

O sangue obtido no oitavo dia do experimento foi utilizado para a realização de hemograma, e a determinação da concentração sistêmica de IFN- γ foi feita com as amostras obtidas no décimo dia. Para obtenção do plasma, as amostras foram centrifugadas a 1500 \times g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorf e armazenados à -20°C até o momento do uso.

4.2.4.2. ELISA para Determinação de Interferon Gama (IFN- γ)

A determinação da concentração plasmática de IFN- γ nos camundongos foi realizada por ELISA de captura em placas de 96 poços (Nunc-ImmunoTM) com reagentes da Pharmingen BD Biosciences, seguindo as recomendações do fabricante. No experimento piloto 1 e no experimento real foram utilizadas amostras plasmáticas obtidas dez dias após a primeira injeção do plasmídeo.

Inicialmente a placa (“High Binding”) foi sensibilizada durante 16 horas, em câmara úmida à 4°C , com 0,1 μg por poço do anticorpo primário anti-IFN- γ / clone RA-642 (18181D) diluído em tampão de sensibilização carbonato 0,1M pH 9.6. Em seguida a placa foi lavada duas vezes com 200 μL por poço de PBS / 0,05% de Tween 20 e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 200 μL por poço da solução de bloqueio PBS / 10 % de SFB durante 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Após nova lavagem (2X), aplicaram-se 100 μL por poço das amostras plasmáticas dos animais diluídas 1:2 em PBS / 10 % de SBF, em duplicata. A curva padrão foi obtida pela diluição seriada da citocina recombinante IFN- γ (19301T), em duplicata, com concentração inicial e final de 30 e 0,029 ng / mL, respectivamente. As amostras e o padrão diluídos foram incubados por 4 horas à temperatura ambiente, após o qual foi feita a lavagem (4X). O anticorpo secundário

biotinilado de rato clone XMG1.2 (18112D) foi aplicado à placa na concentração de 0,1 µg por poço, diluído em PBS / 10 % de SBF, e incubado durante 45 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A placa foi lavada 6 vezes e 100 µL por poço do conjugado avidina-peroxidase, diluído 1:400 em PBS / 10 % de SBF, foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após oito lavagens, foi adicionado o substrato com 1 mg de TMB em DMSO, tampão citrato-fosfato 0,05M e 0,02 % de peróxido de hidrogênio 30V. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL por poço de ácido fosfórico 1:20 e a leitura foi realizada com filtro de 450 nm, usando-se espectrofotômetro modelo Microplate Reader EL311. A concentração de cada citocina foi estimada pela comparação dos valores de densidade óptica das duplicatas da cada amostra teste com os da curva padrão, usando o programa Softmax 3.0, corrigidas pelo fator de diluição.

4.2.4.3. Hemograma

Para a realização do hemograma, no experimento piloto 1 e no experimento real, foi utilizado o sangue obtido oito dias após a primeira administração plasmideal. O aparelho utilizado para a avaliação hematológica foi ADVIA 60 Closed Tube.

4.2.4.4. Avaliação da Capacidade Proliferativa de Esplenócitos

Foi utilizado o protocolo de linfoproliferação segundo Plebanski (2000). Inicialmente foi feita a remoção do baço em condições de esterilidade e parte do órgão foi macerado em uma placa de petri de 35 mm de diâmetro de poliestireno contendo 2 mL de RPMI 1640 com 60 µg / mL gentamicina. A maceração do órgão foi feita com o auxílio de um êmbolo de seringa sobre uma malha fina. A suspensão de células obtidas foi centrifugada 100 x g, por 15 segundos, para a remoção de debris celulares, e posteriormente a 450 x g, por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 2 mL de RPMI 1640 enriquecido com 10% de SBF, 1% L-glutamina 200 mM e 0,01% 2-mercaptoetanol 0,1M, diluído 1:10 em azul de tripan 0,4% e contado um mínimo de 100 células em câmara de Neubauer. As células foram transferidas para placas de 96 poços, na concentração 3×10^5 células por poço, e 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado com Con A a 4 µg / mL foram acrescentados por poço. As placas foram incubadas durante 3 dias em estufa a 37°C com 5% CO₂ em atmosfera úmida. Em seguida, 1

μCi por poço de timidina tritiada diluída em meio RPMI completo foi aplicado, a placa retornou à estufa por 18 horas, sendo mantida à -20°C até a transferência para o filtro de fibra de vidro e leitura no contador beta direto modelo Matrix 9600. Os resultados foram expressos em índice de proliferação.

4.2.4.5. Determinação do Peso Corporal

A determinação do peso corpóreo dos camundongos foi realizada na balança elétrica AS 1000C, sempre no mesmo horário para minimizar possíveis variações decorrentes à ingestão de água e alimentos e à fisiologia animal. Os animais do experimento piloto 1 foram pesados nos dias zero, dois e dez após a primeira injeção do plasmídeo. Nos experimentos piloto 2 e experimento real, os animais foram pesados diariamente.

4.2.4.6. Avaliação Morfológica

4.2.4.6.1. Determinação de Peso de Órgãos

Após o sacrifício, o peso de alguns órgãos foi obtido utilizando a balança Ohaus Explorer Analytical Series. No experimento piloto 1 foram pesados baço e linfonodo poplíteo. No experimento piloto 2 e no experimento real foram pesados os seguintes órgãos: baço, fígado e linfonodos poplíteo e inguinal. A relação entre o peso corporal medido no dia do sacrifício e o peso dos órgãos foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%.

4.2.4.6.2. Histopatologia e Morfometria

Imediatamente após o sacrifício dos camundongos do experimento piloto 1, pequenos fragmentos do baço foram fixados em formalina 10% por 2 dias. Os fragmentos teciduais foram encaminhados à Unidade de Histopatologia do CPqGM, onde foram processados, embebidos em parafina, cortados em seções com $5\ \mu\text{m}$, corados com Hematoxilina-Eosina

(HE). As lâminas coradas foram avaliadas por microscopia óptica e a análise morfométrica semi-automática foi realizada usando o software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics).

Para a determinação da proporção da polpa branca e vermelha em relação à área total esplênica, foram realizadas medições em três secções diferentes de cada animal, e determinada uma média. Foram obtidas a área total e da polpa branca do baço, em mm^2 , e a área da polpa vermelha foi determinada pela subtração das duas anteriores sendo, em seguida, calculada a proporção de cada área esplênica em relação à totalidade do órgão. Para a determinação das figuras apoptóticas foram observadas as características histológicas típicas de apoptose em três áreas de $0,032 \text{ mm}^2$, aleatoriamente escolhidas nas polpas branca e vermelha, em três secções histológicas diferentes de cada animal. Em seguida procedeu-se o somatório das estruturas apoptóticas em cada região do baço, sendo determinada a média e o desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Resposta Imune de Cães Injetados com Antígenos Recombinantes de *Leishmania chagasi/L. infantum* e Plasmídeo Codificando IL-12 Canina

Visando a avaliação, em caráter preliminar, da imunogenicidade de dois antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi/L. infantum* (denominados Lc9 e Lc13), foi realizado um experimento piloto no qual cães foram imunizados e as respostas imunes humoral e celular específica foram estudadas.

5.1.1. Avaliação de Resposta Imune Humoral

A produção de anticorpos da classe IgG reativos a extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* ou aos antígenos recombinantes Lc9 ou Lc13 foi avaliada em amostras de soro de cada cão coletadas 145 dias antes, bem como, 35 e 56 dias depois, da primeira dose de imunização, sendo que as duas últimas coletas corresponderam a 15 dias após a segunda e a terceira dose de imunização, respectivamente. As amostras de soro foram avaliadas, na diluição de 1:400, por ELISA (Anexo 2).

O grupo controle negativo, formado por animais injetados com saponina em salina, revelou média aritmética de densidade óptica, no ensaio para a avaliação de anticorpos reativos a extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13, de: 0,25; 0,82; 0,66 (antes); 0,49; 1,10; 0,68 (depois da segunda) e 0,64; 0,34; 0,46 (depois da terceira dose de imunização), respectivamente (Figura 1).

O grupo de animais injetados com os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13, associados a saponina em salina, apresentou média aritmética da densidade óptica, no ensaio para a mensuração de anticorpos reativos ao extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13, de: 0,30; 0,42; 0,52 (antes); 2,53; 2,81; 1,88 (depois da segunda) e 2,66; 1,53; 1,53 (depois da terceira dose de imunização), respectivamente (Figura 1).

Finalmente, o grupo de cães imunizados com os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13, associados à saponina em salina, e injetados com plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 exibiu média aritmética da densidade óptica no ensaio para avaliação de anticorpos reativos a extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13 de: 0,39; 0,92; 1,11 (antes); 2,53;

2,75; 1,94 (depois da segunda) e 2,47; 1,50; 1,54 (depois da terceira dose de imunização), respectivamente (Figura 1).

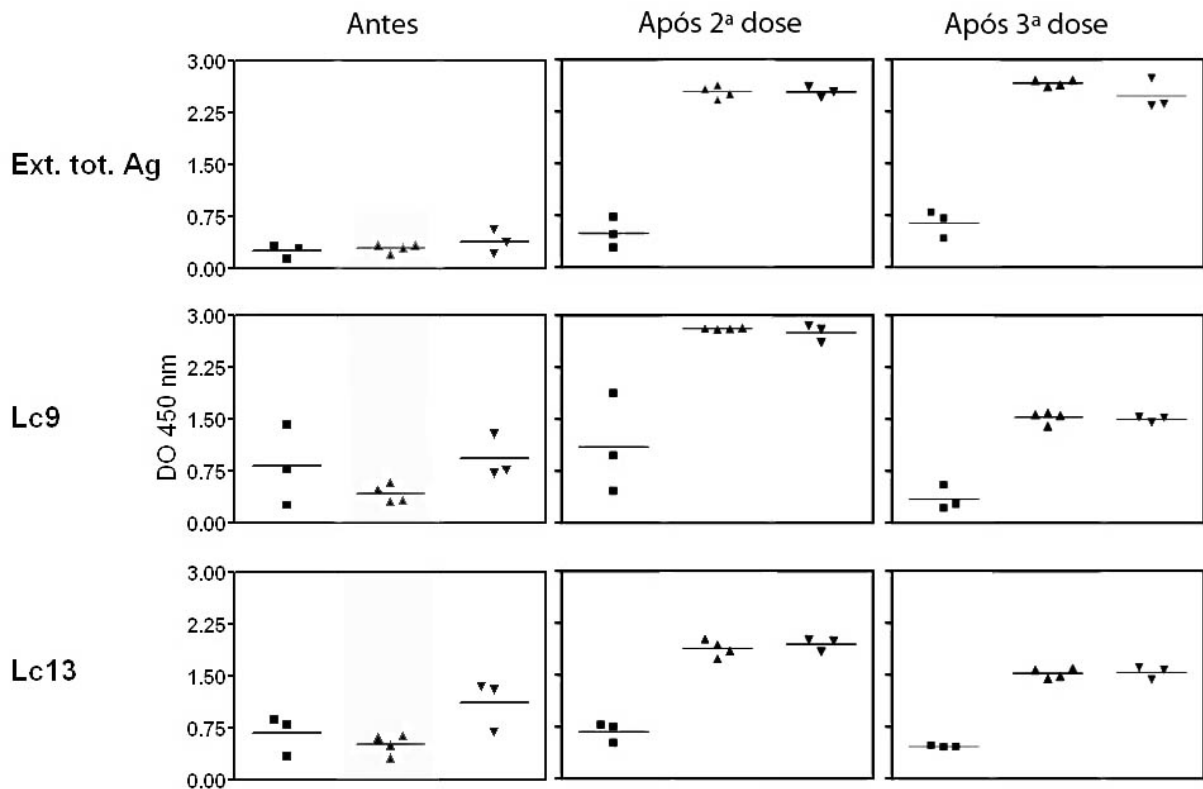


Figura 1. Avaliação da produção de anticorpos da classe IgG reativos a extrato total de antígenos (**Ext. tot. Ag**) e antígenos recombinantes de *L. chagasi*/*L. infantum* (**Lc9** e **Lc13**) em cães injetados com 1 mg de saponina em salina (■), 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13 e 1 mg de saponina em salina (▲) ou 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13, 1 mg de saponina em salina e 800 µg de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 (▼), conforme descrito em Materiais e Métodos. A avaliação de anticorpos específicos foi realizada por ELISA, antes (dia -145), depois da segunda dose (dia 35) e depois da terceira dose (dia 56) de imunização. Placas de microtitulação de 96 poços sensibilizadas com 100 µL de extrato total de antígenos de *L. chagasi*/*L. infantum* a 10 µg/mL, de Lc9 a 4 µg/mL ou de Lc13 a 5 µg/mL foram usadas para testar amostras de soro, em duplicata, na diluição de 1:400. Os anticorpos de cão foram detectados com anticorpos produzidos em cabra, purificados por cromatografia de afinidade, e conjugados à peroxidase, usados na diluição de 1:1000, e com substratos TMB e H₂O₂, em tampão acetato/citrato. A reação enzimática foi interrompida pelo acréscimo de ácido sulfúrico a 4 M (50 µL/poço) e, em seguida a leitura da densidade óptica (DO) foi realizada a 450 nm.

5.1.2. Avaliação da Resposta Imune Celular

5.1.2.1. Linfoproliferação

A capacidade de CMNSP de cães de proliferar quando estimuladas com extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* ou Con A foi determinada em ensaios realizados 156 dias antes, 71 dias e 233 dias depois da primeira dose de imunização, sendo que as últimas duas coletas corresponderam a 29 dias e 21 dias após a terceira e a quarta dose de imunização, respectivamente.

Os valores da média aritmética do índice de proliferação dos grupos de cães injetados com: a) saponina em salina (grupo controle negativo), b) os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13 associados a saponina em salina, e c) os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13 associados a saponina em salina e plasmídeo pcDNA3.1scca-IL-12, e d) extrato total de antígenos e depois infectados com *L. chagasi/L. infantum* (grupo usado como controle positivo), nos ensaios realizados nos dias -156 (i), 71 (ii) e 233 (iii), onde a estimulação foi realizada com 20 µg/mL de extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*, foram: i) 1, 2, 1, 5; ii) 8, 12, 4, 89 e iii) 4, 18, 6, 14, respectivamente (Figura 2). Já os valores correspondentes nos ensaios onde a estimulação foi realizada com 4 µg/mL de Con A foram: (i) 19, 34, 14, 28; (ii) 303, 309, 155, 291 e (iii) 72, 102, 61, 73, respectivamente (Figura 2). Infelizmente, devido a um problema técnico ocorrido durante o processo de purificação, só foram estudadas amostras de CMNSP de dois cães do grupo controle negativo após a terceira dose de imunização.

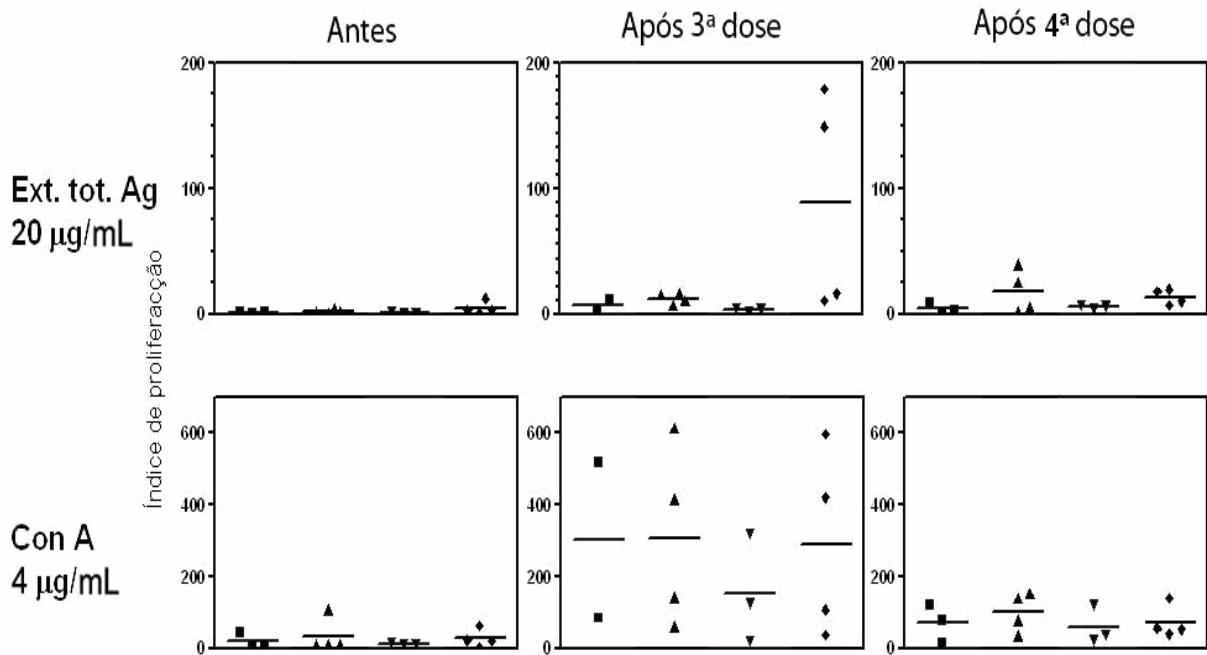


Figura 2. Avaliação da resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico de cães após estimulação com extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* (**Ext. tot. Ag**) ou concanavalina A (**Con A**), de cães injetados com: (i) 1 mg de saponina em salina (grupo controle negativo, **Salina**, ■), (ii) 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13 e 1 mg de saponina em salina (grupo **Lc9/Lc13**, ▲), (iii) 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13, 1 mg de saponina em salina e 800 µg de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 (grupo **Lc9/Lc13/pIL-12**, ▼) ou (iv) extrato total de antígenos e depois infectados com *L. chagasi/L. infantum* (grupo usado como controle positivo, **Ext. tot. Ag + Infecção**, ◆), conforme descrito em Materiais e Métodos. A avaliação de resposta proliferativa foi realizada antes (dia -156), depois da terceira dose (dia 71) e depois da quarta dose (dia 233) de imunização. Triplicatas de poços de placas de microtitulação de 96 poços com 2×10^5 células/poço em apenas meio de cultura ou em meio de cultura e extrato bruto de antígenos *L. chagasi/L. infantum* (Ext. Tot Ag) 20 µg/mL, ou ainda, em meio de cultura e Con A a 4 µg/mL, em um volume total de 200 µL/poço, foram incubadas por três dias (meio de cultura apenas, e meio de cultura e Con A) ou cinco dias (meio de cultura apenas, e meio de cultura e Ext. Tot Ag), sendo que 18 horas antes da interrupção da cultura, 1 µCi de timidina tritiada foi acrescentado em cada poço. As células foram coletadas em fibra de vidro, e os índices de proliferação foram determinados conforme descritos em Material e Métodos. As barras representam a média aritmética de índice de proliferação.

5.1.2.2. Produção de Interferon Gama (IFN- γ)

A produção de IFN- γ em sobrenadante de CMNSP foi avaliada 100 dias após a primeira dose de imunização (58 dias após a terceira dose de imunização). Para isso, 10^7 células por poço, em placas de titulação de seis poços, foram cultivadas por 48 horas na presença de: meio de cultura apenas, de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* ou 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de Con A, e a concentração de IFN- γ foi determinada conforme descrito em Material e Métodos.

Os valores da concentração de IFN- γ em sobrenadantes de cultura, de CMNSP mantidas apenas em meio (i), estimuladas com extrato total de antígenos de *L. chagasi/L. infantum*(ii) ou Con A (iii), em cães dos grupos injetados com: a) saponina em salina (grupo controle negativo), b) os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13 associados a saponina em salina, c) os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13 associados a saponina em salina e pcDNA3.1-scca-IL-12, e d) extrato total de antígenos e depois infectados com *L. chagasi/L. infantum* (grupo usado como controle positivo), foram: i) 219, 0, 577, 127; ii) 55, 0, 208, 8500; iii) 23000, 47000, 115533, 30000 (Figura 3). Infelizmente, devido a um problema técnico ocorrido durante o processo de fracionamento de células, não foram estudadas amostras de CMNSP de um cão do grupo salina, dois cães do grupo Lc9/Lc13 e um animal do grupo controle positivo.

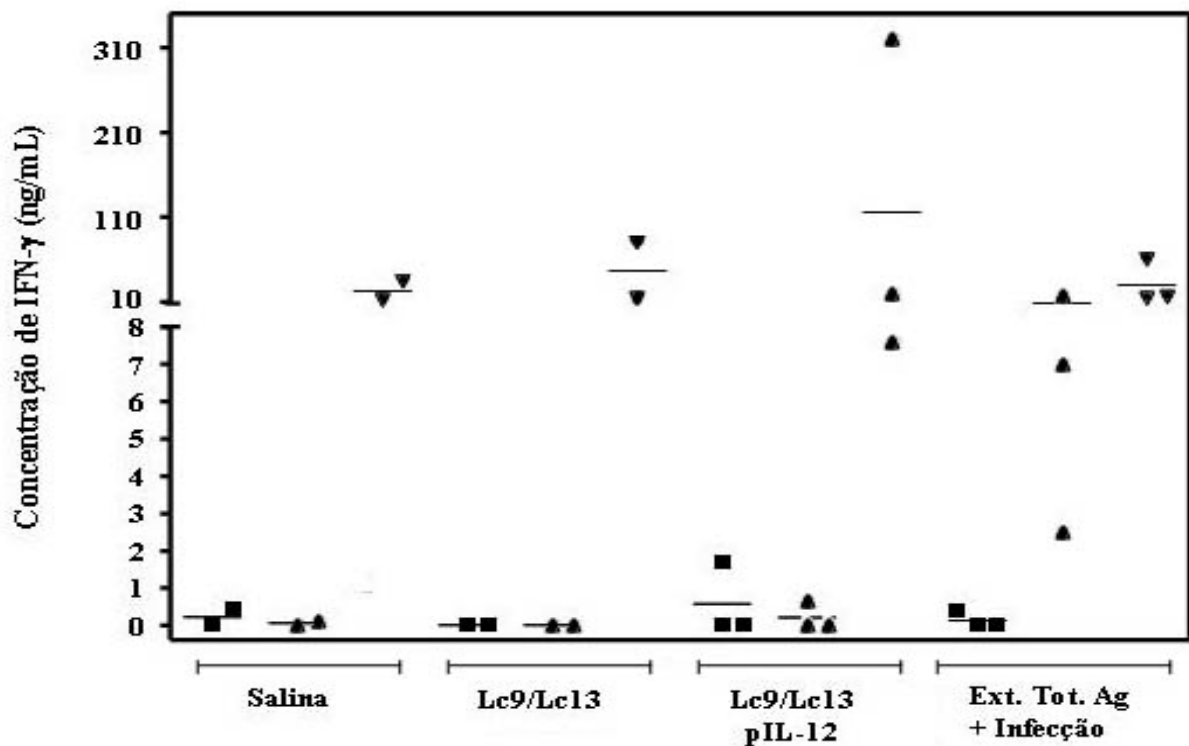


Figura 3. Avaliação da concentração de interferon gama (IFN- γ) em sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico de cães, após cultivo por 48 h apenas com meio (■), com extrato total de antígenos *L. chagasi*/*L. infantum* (▲) ou concanavalina A (▼). Os animais foram injetados com: (i) 1 mg de saponina em salina (grupo controle negativo, **Salina**), (ii) 200 μ g de Lc9, 200 μ g de Lc13 e 1 mg de saponina em salina (grupo **Lc9/Lc13**), (iii) 200 μ g de Lc9, 200 μ g de Lc13, 1 mg de saponina em salina e 800 μ g de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 (grupo **Lc9/Lc13/pIL-12**) ou (iv) com extrato total de antígenos e depois infectados com *L. chagasi*/*L. infantum* (grupo usado como controle positivo, **Ext. Tot. Ag + Infecção**), conforme descrito em Materiais e Métodos. A avaliação da concentração de IFN- γ foi realizada por ELISA de captura 100 dias após a primeira dose de imunização, 58 dias depois da terceira dose de imunização. Os símbolos representam a concentração de IFN- γ de cada animal avaliado e as barras representam a média aritmética da concentração de IFN- γ de cada grupo de cão relacionada a cada condição de cultura usada.

5.2. Avaliação dos Efeitos da Administração de Plasmídeo Codificando IL-12 Murina por Eletroporação em Camundongos

Como os resultados do experimento piloto realizado com os cães, mencionado acima, sugeriam que a imunização com as proteínas recombinantes Lc9 e Lc13 de *L. chagasi/L. infantum*, associadas ou não a pcDNA3.1-scca-IL-12, promove a indução de imunidade humoral e deixa de promover resposta imune celular, para avanço no desenvolvimento de uma vacina, tornou-se necessária determinação de condições de uso de IL-12 capazes de favorecer a indução de resposta imune celular do tipo Th1. Para isso, foram realizados experimentos preliminares em camundongos, nos quais, plasmídeo codificando IL-12 murina (pcDNA3.1-scmu-IL-12) foi administrado por eletroporação nesses animais. Resultados de alguns desses experimentos são descritos a seguir. Em tais experimentos, camundongos da linhagem C3H/Hej ou C57Bl/6 foram injetados duas vezes, via intramuscular, com 50 µg de plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, com intervalo de dois dias entre as injeções. Após cada injeção de plasmídeo foi realizada eletroporação local. Quando corrente elétrica (usada no processo de eletroporação) é aplicada em uma área submetida à injeção de plasmídeo codificando uma proteína recombinante ocorre favorecimento de uma maior entrada do plasmídeo em células locais e resulta em uma produção mais elevada da proteína, em comparação com administração do plasmídeo sem a aplicação de corrente elétrica.

5.2.1. Avaliação da Concentração de Interferon Gama (IFN-γ) no Plasma

A concentração de IFN-γ foi determinada em amostras de plasma coletadas dez dias após o dia da primeira injeção de plasmídeo.

A concentração de IFN-γ no plasma de cada um dos três camundongos do grupo controle, injetados com pcDNA3.1 vazio (grupo P1-pVazio EL) no experimento piloto 1 (ver Material e Métodos), nos animais da linhagem C3H/Hej, estava abaixo do limite de detecção do ensaio de ELISA, que foi de 0,11 ng/mL. Por outro lado, todos os animais do grupo propósito, injetados com plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 (grupo P1-pIL-12 EL), apresentaram níveis detectáveis de IFN-γ, com média e desvio padrão ($X \pm SD$) de $2,7 \pm 2,3$ ng/mL, respectivamente.

No experimento real realizado com camundongos C3H/Hej (ver Material e Métodos), a concentração de IFN-γ de cinco dos seis animais do grupo E-pVazio EL estava abaixo do

limite de detecção do ensaio. O animal do grupo controle, que apresentou nível mensurável da citocina, exibiu concentração plasmática de 0,12 ng/mL. No grupo E-pIL-12 EL, um animal tinha valor plasmático de IFN- γ inferior ao nível mínimo de detecção. A média e o desvio padrão ($X \pm SD$) dos quatro animais do grupo propósito que apresentaram níveis detectáveis de IFN- γ foi $0,51 \pm 0,31$ ng/mL (Figura 4). Considerando como 0,11 ng/mL o valor da concentração de IFN- γ de cada animal cuja concentração ficou abaixo do limite de detecção do ensaio (0,11 ng/mL), os valores de $X \pm SD$ do grupo E-pIL-12 EL foram: $0,43 \pm 0,32$. Além disso, a comparação entre os valores de concentração plasmática de IFN- γ dos grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL, realizada por test “t” não pareado de Student, revelou diferença significativa ($p < 0,05$).

No experimento piloto, no qual, camundongos da linhagem C57Bl/6 (ver Material e Métodos) foram injetados com plasmídeo pcDNA3.1 vazio ou pcDNA3.1-scmu-IL-12, por eletroporação, os níveis de IFN- γ plasmáticos não foram determinados.

No experimento real realizado com camundongos da linhagem C57Bl/6 (ver Material e Métodos), os sete animais injetados com salina (grupo E-Salina EL) apresentaram concentração plasmática de IFN- γ abaixo do limite de detecção do ensaio (0,11 ng/mL). Nos grupos injetados com pcDNA3.1 vazio (grupo E-pVazio EL) e pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (grupo E-pIL-12), um de sete animais apresentou nível detectável da referida citocina, sendo os valores de concentração plasmática de 0,19 e 0,15 ng/mL, respectivamente. No grupo de camundongos injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (grupo E-pIL-12 EL), um de oito animais apresentou concentração plasmática de IFN- γ abaixo do limite de detecção do ensaio. Os valores de concentração plasmática de IFN- γ dos outros sete animais desse grupo foram de $0,64 \pm 0,81$ ng/mL (Figura 4).

Considerando como 0,11 ng/mL a concentração de IFN- γ de cada animal da linhagem C57Bl/6 cujo valor ficou abaixo do limite de detecção do ensaio, os valores da $X \pm SD$ do grupo E-pIL-12 EL foram: $0,58 \pm 0,78$. A comparação entre os valores de concentração plasmática de IFN- γ dos quatro grupos, realizada por ANOVA, não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$).

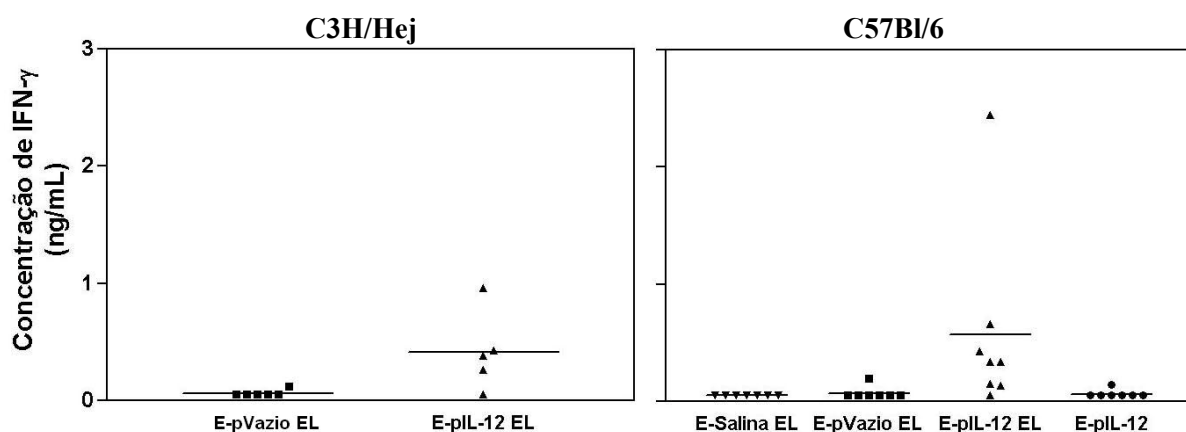


Figura 4. Avaliação da concentração de interferon gama (IFN- γ) em plasma de camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6, no experimento realizado com ambas linhagens, dez dias após a primeira imunização. Os animais foram injetados salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os símbolos representam os valores de IFN- γ correspondente a cada animal avaliado e as barras representam a média aritmética.

5.2.2. Avaliação de Parâmetros Hematológicos

Os valores de hematócrito e a concentração de leucócitos, incluindo a de algumas de suas subpopulações (granulócitos, linfócitos e monócitos) foram determinados em amostras de sangue coletadas oito dias após a aplicação da primeira injeção de plasmídeo nos camundongos. Infelizmente, não foi realizada a mensuração dos parâmetros hematológicos do experimento piloto realizado com camundongos da linhagem C57Bl/6.

Os valores de hematócrito (porcentagem, $X \pm SD$) encontrados nos grupos de camundongos P1-pVazio EL e P1-pIL-12 EL, do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/Hej, foram: $40,7 \pm 3,8$ e $36,5 \pm 2,4$, respectivamente. No experimento real realizado com animais da linhagem C3H/Hej, os grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL apresentaram os valores de hematócrito $42,9 \pm 1,5$ e $40,5 \pm 2,6$, respectivamente (Figura 5). Infelizmente, devido ao fato de ter ocorrido coagulação em uma das amostras, não foi realizada a mensuração de hematócrito de um dos animais do grupo E-pIL-12 EL. A comparação estatística dos valores de hematócrito, realizada por teste “t” não pareado de Student, não revelou diferença significativa entre os grupos de camundongos.

No experimento realizado com camundongos da linhagem C57Bl/6, os grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 revelaram as cifras de hematócrito $38,4 \pm 2,7$; $39,3 \pm 1,2$; $37,3 \pm 2,6$ e $39,3 \pm 1,1$, respectivamente (Figura 5). A comparação estatística dos valores, realizada por ANOVA, não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Além da mensuração de hematócrito, também foi determinada a concentração de hemácias por mm^3 e a concentração de hemoglobina por 100 μL de sangue nos animais do experimento piloto realizado com camundongos da linhagem C3H/Hej e do experimento real realizado com as linhagens C3H/Hej e C57Bl/6. Os valores encontrados estavam dentro do limite de normalidade e a comparação estatística não revelou diferença significativa entre os grupos (ver Anexo 6).

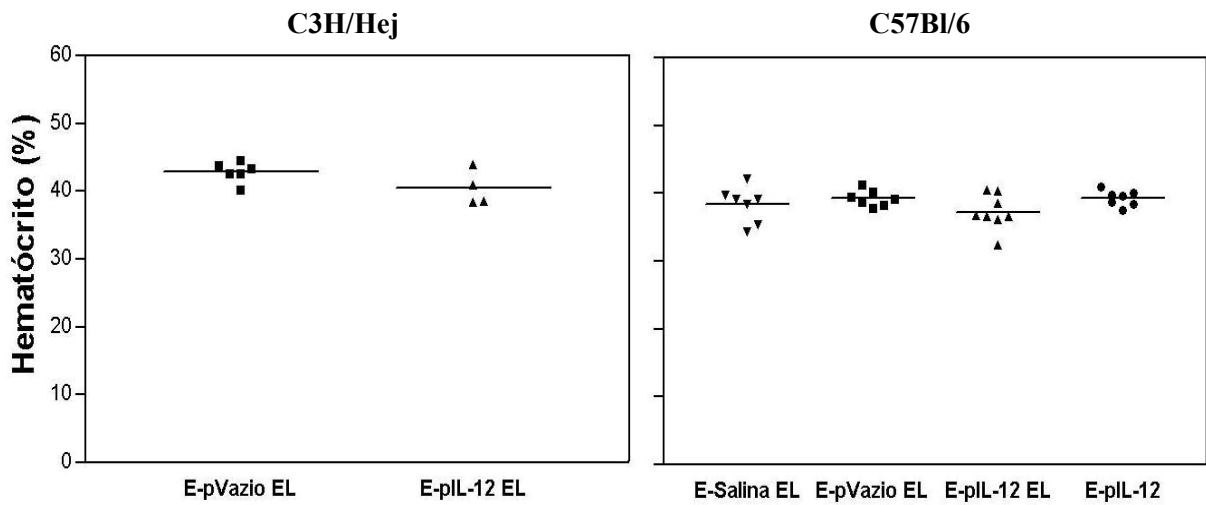


Figura 5. Determinação dos valores de hematócrito nos camundongos C3H/Hej e C57Bl/6 no experimento realizado com ambas linhagens, oito dias após a primeira imunização. Os animais foram injetados salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os símbolos representam os valores do hematócrito correspondente a cada animal avaliado e as barras representam a média aritmética.

Os grupos de camundongo P1-pVazio EL e P1-pIL-12 EL, do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/Hej, apresentaram uma concentração de leucócitos e de suas subpopulações, granulócitos, linfócitos e monócitos, de: 6.667 ± 1.747 , 1.000 ± 529 , 4.467 ± 611 , 1.200 ± 693 e 3.750 ± 1.843 , 750 ± 451 , 2.250 ± 968 , 750 ± 436 células por milímetro cúbico de sangue ($X \pm SD$), respectivamente. Já os grupos de camundongo, E-pVazio EL e E-pIL-12 EL, do experimento real realizado com animais da linhagem C3H/Hej exibiram as seguintes concentrações de leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos: 6.700 ± 1.010 , 1.300 ± 374 , 4.533 ± 1.136 , 867 ± 207 e 5.050 ± 790 , 1.300 ± 476 , 3.250 ± 719 , 750 ± 191 , respectivamente (Figura 6). Devido ao problema técnico, já mencionado, não foi analisada a amostra de sangue de um dos animais do grupo E-pIL-12 EL.

Os grupos de camundongo E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 do experimento real realizado com animais da linhagem C57Bl/6 revelaram as seguintes concentrações de leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos: 7.343 ± 1.868 , 857 ± 223 , 6.029 ± 1.659 , 457 ± 151 ; 5.514 ± 1.483 , 743 ± 378 , 4.343 ± 1.345 , 429 ± 138 ; 6.125 ± 1.305 , 1.275 ± 260 , 4.275 ± 1.291 , 575 ± 167 e 7.371 ± 2.183 , 943 ± 486 , 5.857 ± 1.590 , 571 ± 214 , respectivamente (Figura 6).

A comparação estatística entre os valores da concentração de leucócitos e de suas subpopulações entre os dois grupos de camundongos da linhagem C3H/Hej ou entre os quatro grupos de camundongos da linhagem C57Bl/6, usando-se teste “t” não pareado de Student e ANOVA, respectivamente, não revelou diferença significativa.

(x10⁹/mm³)

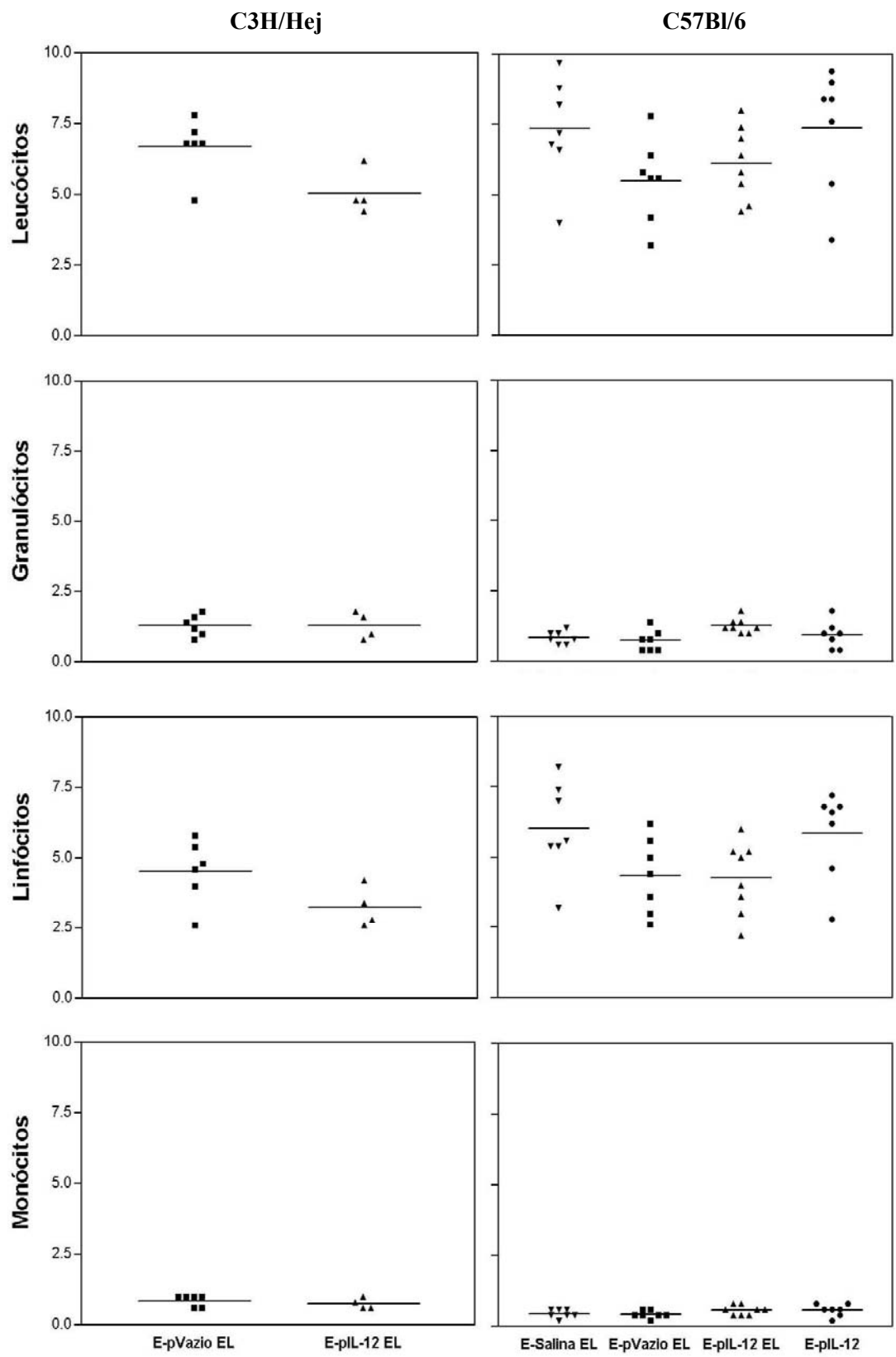


Figura 6. Determinação da concentração de leucócitos e suas subpopulações: granulócitos, linfócitos e monócitos. O hemograma foi realizado oito dias após a primeira injeção, nos camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6. Os animais foram injetados salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os símbolos representam os valores de cada parâmetro correspondente a cada animal avaliado e as barras representam a média aritmética.

5.2.3. Avaliação do Peso Corporal e do Peso de Alguns Órgãos (Fígado, Baço e Linfonodos)

O peso corporal de cada um dos camundongos foi registrado durante o período de um dia antes até 10 dias depois da primeira injeção de plasmídeo. A comparação estatística do peso corporal entre os grupos de animais foi realizada usando-se medidas obtidas 10 dias depois da primeira injeção de plasmídeo.

Os valores do peso corporal ($X \pm SD$) dos grupos P1-pVazio1 EL e P1-pIL-12 EL do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/Hej foram: $22,4 \pm 2,5$ g e $21,9 \pm 2,2$ g, respectivamente. No experimento real realizado com camundongos da linhagem C3H/Hej, os grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL apresentaram as seguintes medidas do peso corporal: $22,3 \pm 2,3$ g e $22,9 \pm 3,4$ g, respectivamente (Figura 7). A comparação estatística dos valores do peso corporal dos dois grupos de animais, usando-se teste “t” não pareado de Student, não revelou diferença significativa.

Os valores das medidas do peso corporal dos grupos de camundongos P2-pVazio EL e P2-pIL-12 EL do experimento piloto realizado com animais da linhagem C57Bl/6 foram $26,2 \pm 0,9$ g e $28,7 \pm 2,1$ g, respectivamente. No experimento real também realizado com camundongos da linhagem C57Bl/6, os grupos injetados com E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL ou E-pIL-12 exibiram como valores das medidas do peso corporal $27,7 \pm 1,5$; $26,6 \pm 2,6$; $26,5 \pm 2,2$ e $27,7 \pm 1,6$, respectivamente (Figura 7). A comparação estatística dos valores das medidas do peso corporal dos quatro grupos de animais, realizada por ANOVA, não mostrou diferença significativa.

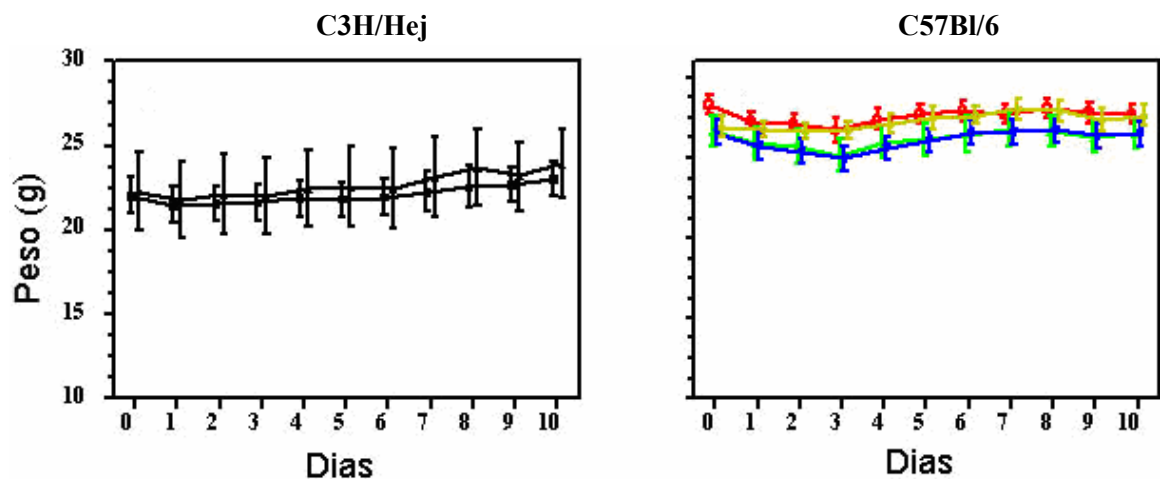


Figura 7. Determinação do peso corporal dos camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6 durante os dez dias do experimento propriamente dito. A determinação do peso foi realizada diariamente, no mesmo horário, em uma única balança, seguindo a mesma seqüência de pesagem. Os animais foram injetados com salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os pontos representam a média de cada grupo experimental, e as barras representam o desvio padrão.

Os valores do peso do fígado ($X \pm SD$) dos grupos de camundongo E-pVazio EL e E-pIL-12 EL do experimento real realizado com animais da linhagem C3H/Hej foram 1.197 ± 177 e 1.311 ± 156 mg, respectivamente (Figura 8). Análise estatística, realizada por teste “t” não pareado de Student, não revelou diferença significativa entre os grupos.

No experimento piloto realizado com animais da linhagem C57Bl/6, os grupos P2-pVazio EL e P2-pIL-12 EL apresentaram os seguintes valores do peso do fígado: 1.484 ± 58 mg e 2.279 ± 343 mg, respectivamente. Já no experimento real realizado com camundongos da C57Bl/6, os valores do peso do fígado exibidos pelos grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 foram de: 1.642 ± 150 mg, 1.474 ± 150 mg, 1.775 ± 177 mg e 1.613 ± 150 mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística dos valores do peso do fígado entre esses grupos foi realizada por ANOVA e pós-teste de Dunnett, que compara os valores do grupo E-Salina EL com os de cada um dos três outros grupos. Embora a média do peso do fígado do grupo E-pIL-12 EL tenha sido a maior dentre os grupos e ANOVA tenha mostrado diferença estatisticamente significativa, o pós-teste não revelou diferença significativa entre qualquer dos três grupos e o grupo E-Salina EL.

Os valores do peso do baço ($X \pm SD$) obtidos nos grupos de camundongo P1-pVazio EL e P1-pIL-12 EL do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/Hej foram de: 154 ± 28 mg e 470 ± 169 mg, respectivamente. Enquanto que, no experimento real realizado com animais da linhagem C3H/Hej, os valores do peso do baço obtidos nos grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL foram de 113 ± 9 mg e 222 ± 85 mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística entre esses grupos, realizada por teste “t” não pareado de Student, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$).

No experimento piloto realizado com animais da linhagem C57Bl/6, os grupos P2-pVazio EL e P2-pIL-12 EL revelaram valores do peso do baço ($X \pm SD$) de: 102 ± 21 e 301 ± 112 mg, respectivamente. Já os valores encontrados do peso do baço ($X \pm SD$), no experimento real realizado com camundongos da C57Bl/6, dos grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 foram de: 85 ± 24 mg, 89 ± 24 mg, 167 ± 77 mg e 78 ± 10 mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística, realizada por ANOVA, mostrou diferença significativa entre os quatro grupos ($p < 0,01$) e o pós-teste de Dunnett revelou que o grupo E-pIL-12 EL era o único grupo que diferia significativamente do grupo E-Salina EL ($p < 0,01$).

Os valores do peso do linfonodo poplíteo ($X \pm SD$) observados nos camundongos do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/Hej, grupos P1-pVazio EL e P1-pIL-12 EL, foram de: $4,7 \pm 1,2$ mg e $4,9 \pm 1,6$ mg, respectivamente, enquanto que os valores

para o mesmo parâmetro, nos grupos correspondentes do experimento real, também realizado com animais dessa linhagem, foram de: $1,3 \pm 0,3$ mg e $2,2 \pm 1,3$ mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística, realizada por teste “t” não pareado de Student, não mostrou diferença significativa entre os grupos do experimento.

Nos grupos P2-pVazio EL ou P2-pIL-12 EL do experimento piloto realizado com animais da linhagem C57Bl/6, os valores do peso do linfonodo poplíteo ($X \pm SD$) achados foram de: $0,4 \pm 0,2$ mg e $2,0 \pm 0,1$ mg, respectivamente. No experimento real também realizado com animais dessa linhagem, os valores do peso do linfonodo poplíteo ($X \pm SD$) encontrados nos grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 foram de: $0,8 \pm 0,2$ mg, $0,7 \pm 0,3$ mg, $2,7 \pm 1,3$ mg e $0,7 \pm 0,1$ mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística, realizada por ANOVA, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que somente o grupo E-pIL-12 EL diferia significativamente do grupo E-Salina EL ($p < 0,01$).

No experimento piloto, realizado com os animais da linhagem C3H/Hej, não foi realizada a mensuração do peso do linfonodo inguinal. No experimento real com C3H/Hej, os grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL apresentaram os seguintes valores do peso do linfonodo inguinal ($X \pm SD$): $3,5 \pm 0,9$ mg; $9,8 \pm 5,6$ mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística, realizada por teste “t” não pareado de Student, mostrou diferença significativa ($p < 0,05$).

No experimento piloto, realizado com animais da linhagem C57Bl/6, os grupos P2-pVazio EL e P2-pIL-12 EL exibiram os valores do peso do linfonodo inguinal ($X \pm SD$): $4,6 \pm 1,0$ mg e $12,1 \pm 8,0$ mg, respectivamente. No experimento real, também realizado com camundongos da mesma linhagem, os valores do peso dos linfonodos inguinal ($X \pm SD$) dos grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12 foram $2,6 \pm 0,6$ mg, $2,8 \pm 1,1$ mg, $7,8 \pm 2,6$ mg e $2,8 \pm 0,8$ mg, respectivamente (Figura 8). A comparação estatística, realizada por ANOVA, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que apenas o grupo E-pIL-12 EL diferia significativamente do grupo E-Salina EL ($p < 0,01$).

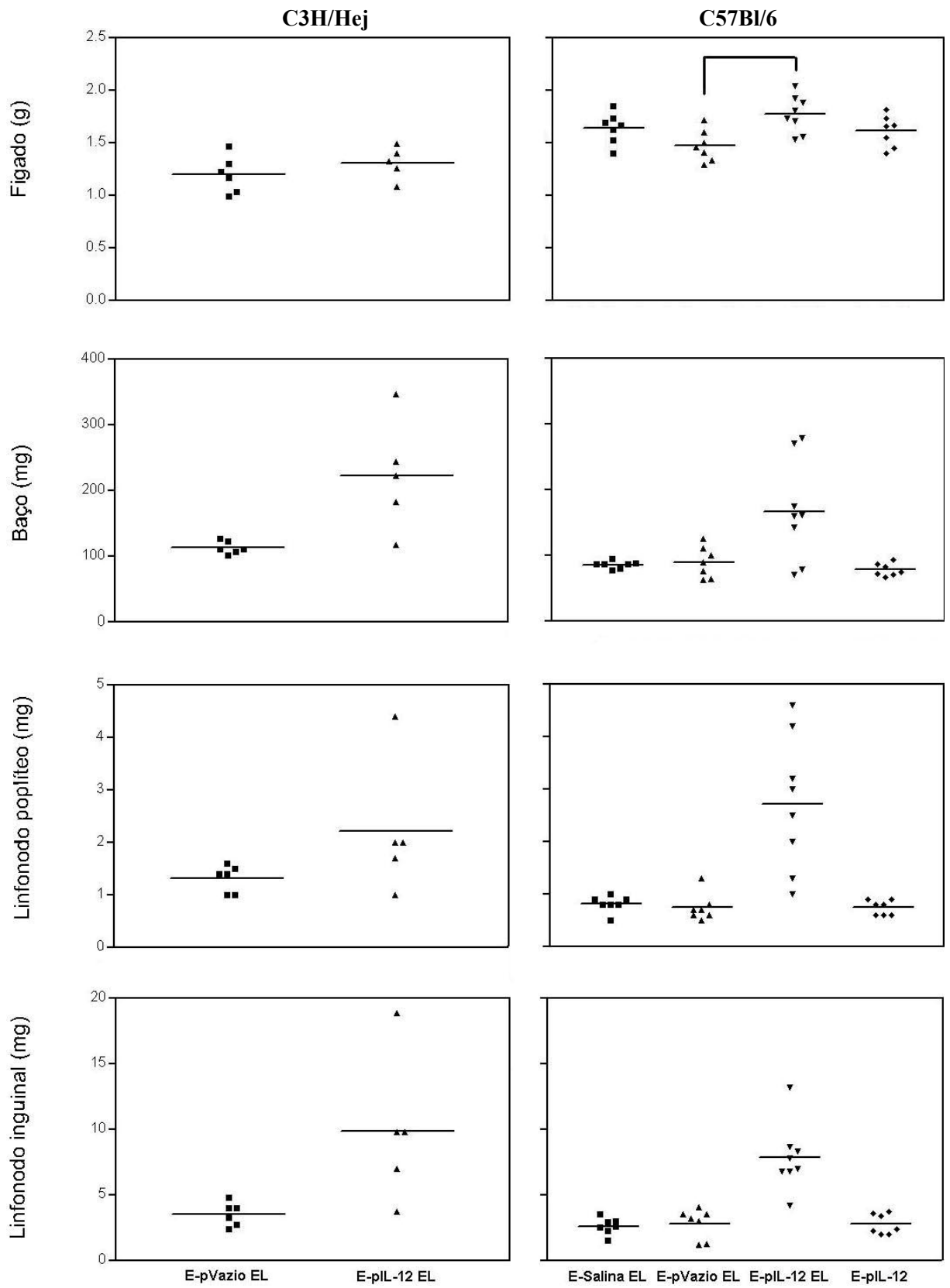


Figura 8. Determinação do peso do fígado (g), baço e linfonodos poplíteo e inguinal (mg) dos camundongos das linhagens C3H/HeJ e C57Bl/6 obtidos no dia do sacrifício, dez dias após a primeira injeção. Os animais foram injetados com salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os símbolos representam os valores de cada parâmetro correspondente a cada animal avaliado e as barras representam a média aritmética.

5.2.4. Avaliação Histológica do Baço

A coleta de fragmentos de tecido esplênico para a avaliação histológica foi realizada 10 dias após a primeira injeção de plasmídeo, no momento do sacrifício dos animais. Infelizmente, devido a problemas técnicos ocorridos no processamento histológico, somente puderam ser analisadas secções de baço dos camundongos do experimento piloto realizado com animais da linhagem C3H/HeJ.

As secções de baço dos camundongos do grupo P1-pVazio EL apresentavam aspectos histológicos normais (Figuras 9, 10 e 11). A medida ($X \pm SD$) da área total do baço, polpa branca e polpa vermelha dos animais do grupo P1-pVazio EL foi $5,4 \pm 0,57$; $1,0 \pm 0,04$ e $4,4 \pm 0,52 \mu\text{m}^2$, respectivamente. A polpa branca apresentava morfologia normal constituída por tecido linfático denso, com números linfócitos na bainha periarteriolar linfática e, nos nódulos linfáticos, praticamente não existiam centros germinativos. A polpa vermelha também exibia aspectos microscópicos normais, com presença de sinusóides e uma malha reticular contendo células reticulares, macrófagos, poucos megacariócitos. A contagem das células apoptóticas ($X \pm SD$), por mm^2 , na área de polpa vermelha revelou a presença de 4 ± 1 figuras de apoptose.

Nos animais do grupo P1-pIL-12 EL foram observadas algumas alterações histológicas (Figuras 9, 10 e 11). A medida ($X \pm SD$) da área total do baço, polpa branca e polpa vermelha dos animais do grupo P1-pIL-12 EL foi $13,0 \pm 3,86$; $1,0 \pm 0,33$ e $12,0 \pm 4,02 \mu\text{m}^2$, respectivamente, demonstrando uma esplenomegalia por expansão da polpa vermelha. A área de polpa branca apresentava aspectos histológicos normais, idênticos aos animais do grupo controle. As alterações observadas na polpa vermelha dos animais do grupo P1-pIL-12 EL foram um intenso pleomorfismo celular com aumento no número de macrófagos vacuolados, megacariócitos e precursores hematopoiéticos neste compartimento esplênico. A contagem das células apoptóticas ($X \pm SD$), por mm^2 , na área de polpa vermelha dos animais deste grupo revelou a presença de 16 ± 3 figuras de apoptose.

P1-pVazio EL

P1-pIL-12 EL

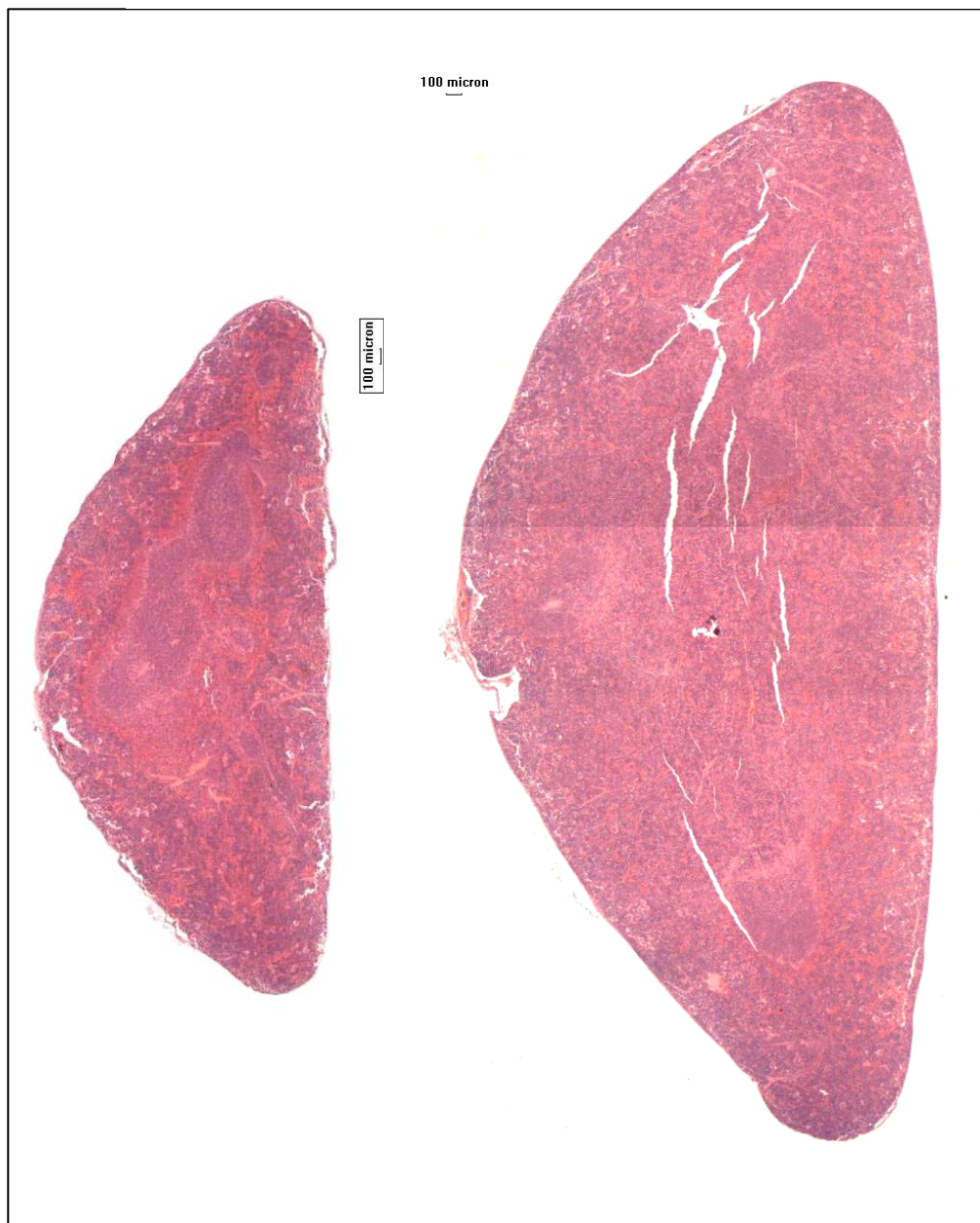


Figura 9. Área total representativa de secções do baço dos camundongos C3H/Hej do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**P1-pVazio EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**P1-pIL-12 EL**), conforme descrito em Material e Métodos. Verifica-se uma notável esplenomegalia, decorrente à expansão da polpa vermelha, e a perda de delimitação da polpa branca no grupo P1-pIL-12 EL quando comparado ao controle P1-pVazio EL.

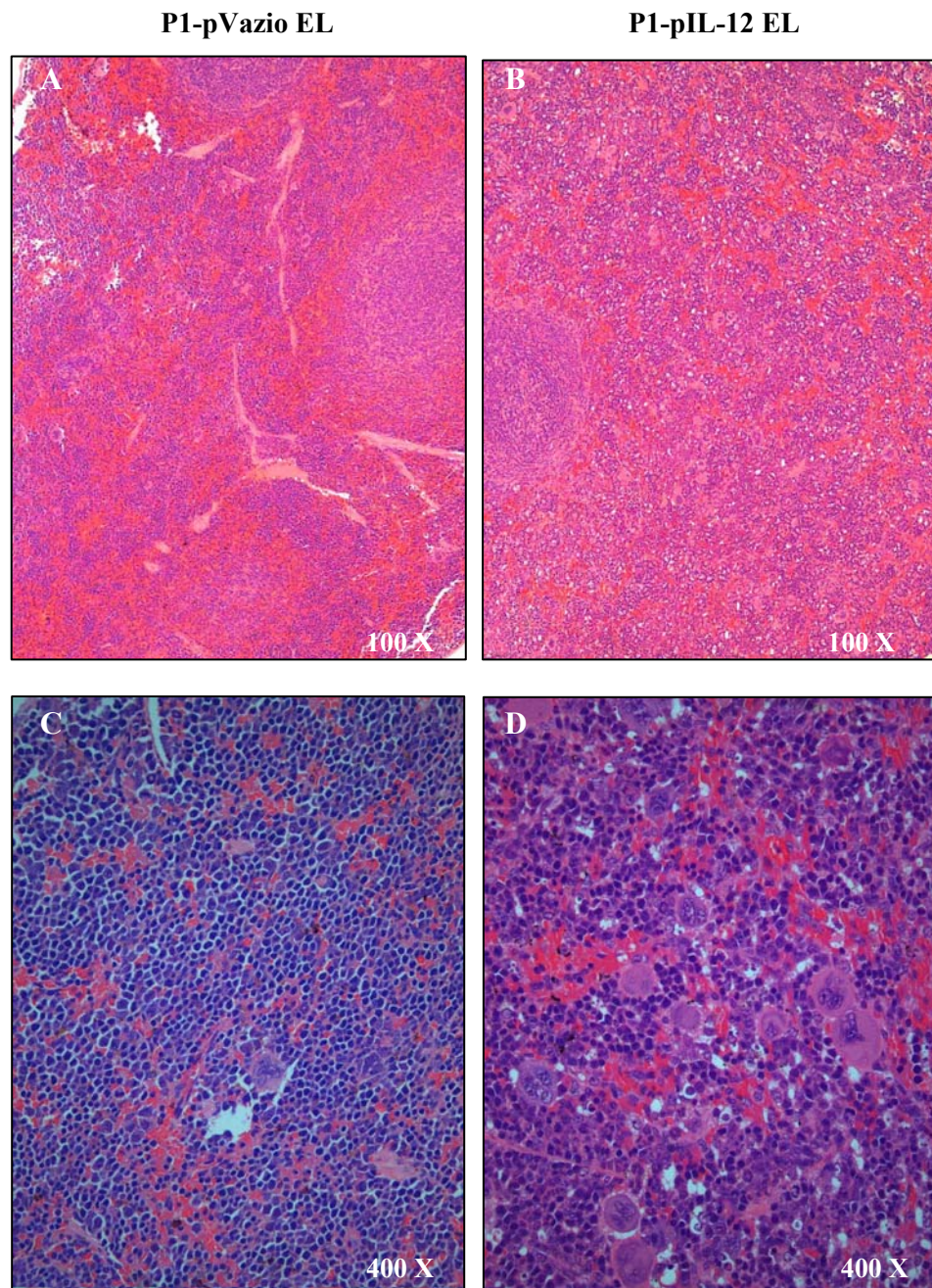


Figura 10. Secções do baço dos camundongos C3H/HeJ do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**P1-pVazio EL**; **A** e **C**) ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 (**P1-pIL-12 EL**; **B** e **D**), por eletroporação, conforme descrito em Material e Métodos. Aspectos histológicos normais (**A** e **C**) podem ser visualizados nos animais do grupo P1-pVazio EL. Na polpa vermelha dos animais do grupo P1-pIL-12 EL é observada, em diferentes aumentos (100X e 400X), a presença de áreas descoradas, brancas, por vezes com pequenos corpúsculos fortemente basófilos ou acidófilos, relacionados à presença de figuras apoptóticas e de macrófagos vacuolares (**B** e **D**). Um aumento no número de megacariócitos também pode ser observado (**D**). Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100 (**A** e **B**) e 400X (**C** e **D**).

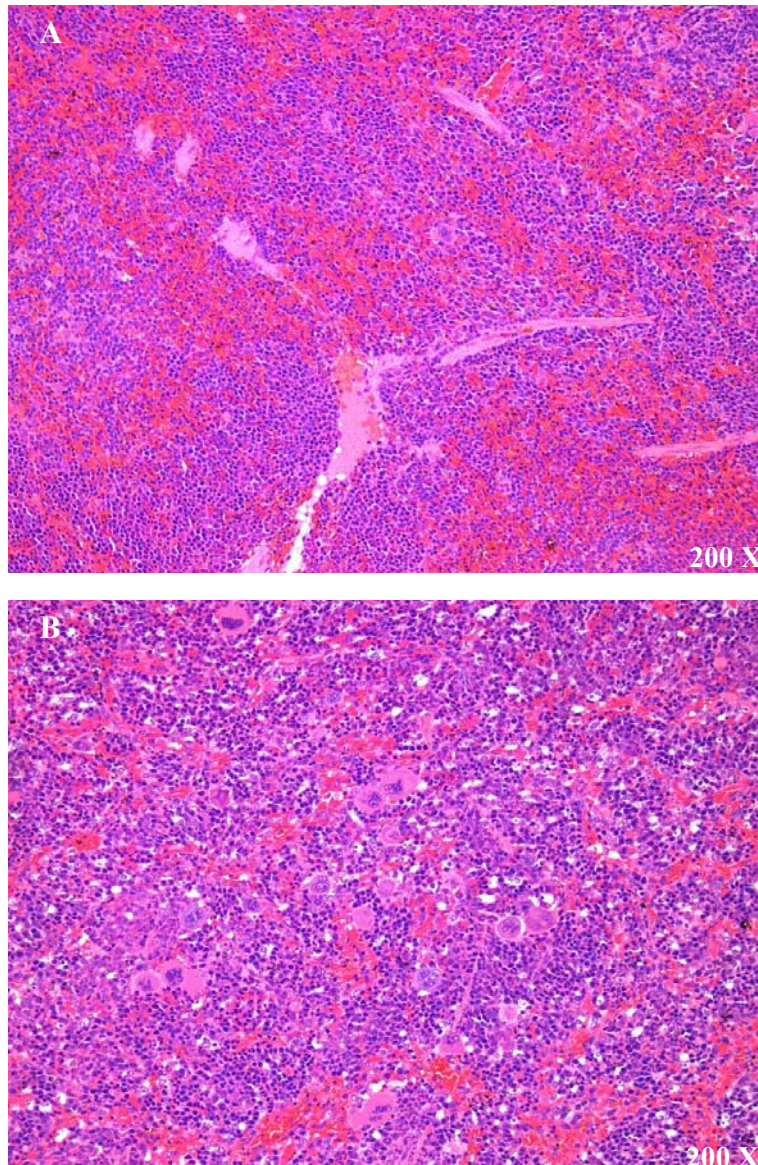


Figura 11. Secções da polpa vermelha do baço dos camundongos C3H/HeJ do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**P1-pVazio EL; A**) ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 (**P1-pIL-12 EL; B**), por eletroporação, conforme descrito em Material e Métodos. Em **A** pode ser visualizado o aspecto histológico normal presente nos animais do grupo P1-pVazio EL. Em **B**, aumento no número de megacariócitos e grande número de áreas claras e descoradas são observados nos animais do grupo P1-pIL-12 EL. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 200X.

5.2.5. Avaliação da Resposta Proliferativa de Esplenócitos após Estimulação com Concanavalina A

O ensaio de linfoproliferação foi realizado com esplenócitos coletados 10 dias após o dia da primeira injeção de plasmídeo. Para a realização do ensaio, esplenócitos foram cultivados em meio de cultura ou meio de cultura contendo Con A a 20 µg/mL em placas de microtitulação de 96 poços. Após três dias de cultivo, timidina radiativa foi adicionada aos poços da placa de microtitulação e cerca de 18 horas depois a cultura foi interrompida, as células foram coletadas e a radiatividade celular foi determinada. Infelizmente, esse ensaio não foi realizado no experimento piloto com a linhagem C3H/Hej.

No experimento real realizado com camundongos da linhagem C3H/Hej, os valores de índices de proliferação (valor de incorporação de timidina radiativa em cpm de células cultivadas na presença de Con A dividido pelo valor obtido quando as células foram cultivadas somente com meio de cultura, $X \pm SD$) dos grupos E-pVazio EL e E-pIL-12 EL foram de: 41 ± 11 e 101 ± 15 , respectivamente (Figura 11). A comparação estatística entre os valores de índice de proliferação, usando-se teste “t” não pareado de Student, revelou diferença significativa ($p < 0,01$).

No experimento piloto realizado com animais da linhagem C57Bl/6, os valores de índice de proliferação ($X \pm SD$) dos grupos P2-pVazio EL e P2-pIL-12 EL foram de: 56 ± 26 e 83 ± 72 , respectivamente. No experimento real realizado com C57Bl/6, os grupos E-Salina EL, E-pVazio EL, E-pIL-12 EL e E-pIL-12, revelaram os seguintes índices de proliferação: 31 ± 18 ; 63 ± 51 ; 23 ± 12 e 21 ± 11 , respectivamente (Figura 11). A comparação estatística, realizada por ANOVA, mostrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), no entanto, o pós-teste de Dunnett não revelou diferença significativa entre o grupo E-Salina EL e cada um dos três outros grupos.

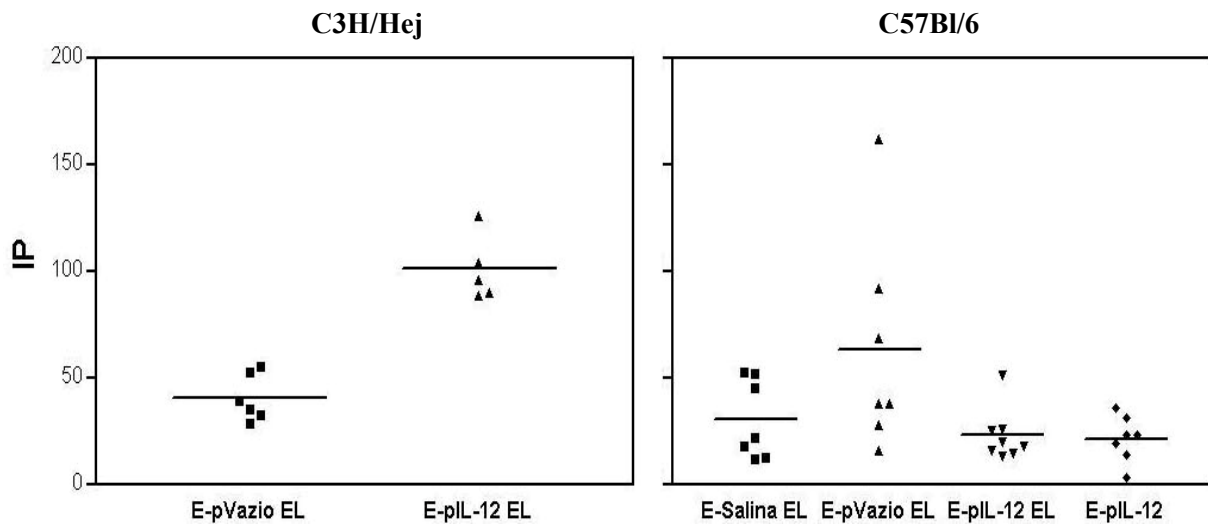


Figura 11. Avaliação da resposta proliferativa dos esplenócitos dos camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6 após estimulação *in vitro* com mitógeno concanavalina A. Os animais foram administrados com salina (**E-Salina EL**), plasmídeo pcDNA3.1 vazio (**E-pVazio EL**), plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação (**E-pIL-12 EL**) ou plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação (**E-pIL-12**), conforme descrito em Materiais e Métodos. A avaliação da resposta proliferativa foi realizada 10 dias após a primeira administração. Triplicatas de poços de placas de microtitulação receberam 3×10^5 células/poço em meio de cultura com o mitógeno concanavalina A a $4 \mu\text{g}/\text{mL}$, em um volume total de $200 \mu\text{L}/\text{poço}$, e foram incubadas por 3 dias, sendo que 18 horas antes da interrupção da cultura, $1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada foi acrescentado em cada poço. As células foram coletadas em fibra de vidro, emissão de irradiação beta foi determinada e índices de proliferação foram determinados, conforme descrito em Material e Métodos. Os símbolos representam os valores de índice de proliferação correspondente a cada animal avaliado, e as barras representam a média aritmética.

6. DISCUSSÃO

Visando contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, no presente trabalho foi realizado um experimento piloto no qual sete cães foram imunizados com dois antígenos recombinantes de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13, em combinação com saponina, sendo que três desses animais foram também injetados com plasmídeo codificando cadeia única de IL-12 canina (pcDNA3.1-scca-IL-12, Santos *et al.* 2004). Como grupo controle negativo e positivo, foram usados três cães injetados com salina, em associação com saponina, e quatro cães injetados com extrato bruto de antígenos, e depois infectados com *L. chagasi/L. infantum*, respectivamente. A avaliação realizada sugere que os cães imunizados com os antígenos recombinantes desenvolveram resposta imune humoral específica, detectada pela presença de anticorpos reativos com cada um dos antígenos recombinantes utilizados e com o extrato bruto de antígenos de *L. chagasi/L. infantum* no soro, no entanto esses animais não apresentaram resposta imune celular específica, avaliada através de ensaio de linfoproliferação e produção de interferon gama, após estimulação com extrato bruto de antígenos de *L. chagasi/L. infantum in vitro*.

Como IL-12 é considerada uma citocina capaz de induzir resposta imune celular do tipo T_H1 (Manetti *et al.* 1994, Afonso *et al.* 1994, Mongneau *et al.* 1995, Bliss *et al.* 1996, Watanabe *et al.* 1999), mesmo quando produzida *in vivo* após administração de plasmídeo contendo seu cDNA (Yamakami *et al.* 2001), e os cães imunizados com antígenos recombinantes Lc9 e Lc13, em associação com plasmídeo codificando IL-12 canina, não desenvolveram resposta imune celular, seria interessante a determinação das condições apropriadas para a utilização de plasmídeo codificando IL-12 como componente de uma vacina (com capacidade de promover resposta imune celular sem causar, ou causando minimamente, efeitos tóxicos). Em experimentos iniciais em camundongos, aqui descritos, foram avaliadas condições presumivelmente capazes de ocasionar efeitos intensos e, até mesmo, efeitos tóxicos para a partir daí, no futuro, serem avaliadas condições mais adequadas ao objetivo proposto.

Uma vez que IL-12 induz efeitos biológicos mais intensos em certas linhagens de camundongos (Leonard *et al.* 1997, Car *et al.* 1999), incluindo C3H/HeJ e C57Bl/6, essas linhagens foram escolhidas para serem utilizadas no presente trabalho. Os camundongos C3H/HeJ e C57Bl/6 injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação apresentaram, no presente estudo, esplenomegalia, aumento do linfonodo inguinal e aumento na concentração plasmática de IFN- γ medida 10 dias após a primeira injeção. Histologicamente, os

camundongos da linhagem C3H/Hej apresentaram expansão da polpa vermelha esplênica, intenso pleomorfismo celular, aumento do número megacariócitos e de macrófagos vacuolares, bem como um grande número de figuras apoptóticas. Adicionalmente, camundongos C3H/Hej exibiram à resposta proliferativa dos esplenócitos mais intensa frente ao mitógeno concanavalina A (Con A). Camundongos da linhagem C57Bl/6 revelaram esplenomegalia, aumento do linfonodo inguinal e aumento no tamanho do linfonodo poplíteo do mesmo lado no qual foi realizada a injeção do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12.

Nos últimos anos, diversas moléculas candidatas a componentes de uma vacina contra leishmaniose visceral canina têm sido testadas em camundongos e/ou no cão. Alguns autores relataram a indução de resposta imune humoral após a imunização de cães com uma fração protéica de *Leishmania chagasi* / *L. infantum* denominada LiF2 (de 67 a 94 kDa) associada ao adjuvante muramil-dipeptídeo, que não ocasionou proteção contra a infecção natural (Ogunkolade *et al.* 1988). Outros autores descreveram formulações vacinais que induziram resposta imune celular que, em menor ou maior grau, foram capazes de promover proteção contra a infecção experimental ou natural no cão (Lasri *et al.* 1999, Da Silva *et al.* 2001, Borja-Cabrera *et al.* 2002, Santos *et al.* 2002, Ramiro *et al.* 2003, Lemesre *et al.* 2005, Saldarriaga *et al.* 2005). Considerando esses dados, embora no presente trabalho não tenha sido realizado o desafio através da infecção por *Leishmania*, provavelmente, os cães imunizados com Lc9 e Lc13 associados ou não ao plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 não desenvolveram resposta imune protetora contra leishmaniose visceral.

Apesar de a resposta imune humoral ser apontada como de pequena importância na proteção de infecção por *Leishmania*, a avaliação da produção de anticorpos específicos, após a imunização, pode ter a utilidade ao indicar se os diversos candidatos a componentes a uma vacina são imunogênicos ou não (Sjolander *et al.* 1998).

Previamente, alguns autores mostraram que a citocina IL-12, quando usada em combinação com antígenos, pode favorecer o desenvolvimento de resposta imune celular específica com o perfil T_H1 (Manetti *et al.* 1993, Afonso *et al.* 1994, Scott & Trinchieri 1997, Gonzalo *et al.* 2001). Além disso, a administração de DNA plasmideal codificando IL-12 também pode promover polarização da resposta imune para um fenótipo T_H1 a antígenos concomitantemente injetados (Zimmermann *et al.* 1998, Kurata *et al.* 2004). Dessa maneira, no presente trabalho, o fato da injeção de pcDNA3.1-scca-IL-12 não promover resposta imune celular contra Lc9 e Lc13 foi inesperada. Contudo, a ausência de indução de resposta imune celular específica poderia ser explicada pela administração excessiva de DNA

plasmídeo codificando IL-12 (800 µg / dose), que promoveria uma superexpressão local de citocinas com atividade inibitória, como por exemplo IL-10, capazes de suprimir a produção de IL-12 e IFN-γ (Tripp *et al.* 1993, Morris *et al.* 1994). Por outro lado, a injeção excessiva pcDNA3.1-scca-IL-12 associada a Lc9 e Lc13 poderia acarretar uma produção elevada de IFN-γ, indução de atividade da óxido-nitro-sintetase 2 (iNOS) e geração óxido nítrico, o qual prejudicaria a proliferação dos linfócitos T (Koblish *et al.* 1998, Lasarte *et al.* 1999, Gherardi *et al.* 2000).

Como a administração do plasmídeo codificando IL-12 foi realizada sem o auxílio de instrumentos como, por exemplo, aparelho de ultrassonografia, para guiar a aplicação de pcDNA3.1-scca-IL-12 dentro do linfonodo poplíteo, uma outra possibilidade para explicar a não indução de resposta imune celular específica nos cães injetados com pcDNA3.1-scca-IL-12 em associação com os antígenos recombinantes seria o insucesso total ou parcial da introdução plasmídeo no local desejado.

Pelas razões apontadas acima, seria interessante avaliarem-se variações do protocolo de imunização aqui descrito, incluindo o uso de doses menores e/ou maiores bem como diferentes vias de administração do plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12.

No presente trabalho, nos experimentos realizados em camundongos, foram observadas esplenomegalia e linfadenomegalia inguinal em ambas as linhagens murinas utilizadas (CH3/Hej e C57Bl/6), após administrações de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação. Além da linfadenopatia inguinal, linfadenopatia poplíteia foi observada apenas na linhagem C57Bl/6. Vários autores relataram o aparecimento de esplenomegalia e linfadenopatia em camundongos, após administração de IL-12 recombinante ou plasmídeo codificando IL-12 (Gately *et al.* 1994, Eng *et al.* 1995, Tare *et al.* 1995, Jackson *et al.* 1995, Leonard *et al.* 1997, Yahata *et al.* 1998, Shi *et al.* 2002), sendo aparentemente reversíveis uma vez de cessados os estímulos de IL-12 (Tare *et al.* 1995, Shi *et al.* 2002).

O desenvolvimento de esplenomegalia nos camundongos injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12, provavelmente, decorre da expansão da polpa vermelha, e a análise histológica realizada em camundongos C3H/Hej revelou aumento das áreas desse compartimento esplênico. Outros autores, ao estudarem camundongos injetados com IL-12, também observaram esplenomegalia associada com aumento de hematopoiese extramedular, envolvendo as linhagens eritróide, mielóide e megacariocítica (Gately *et al.* 1994, Tare *et al.* 1995). Além disso, esses autores também observaram, através de avaliação por citometria de fluxo, um aumento de células NK em camundongos C57Bl/6. Outros autores também

descreveram aumento da celularidade, presença de infiltrado de células NK e macrófagos, bem como hematopoiese (Eng *et al.* 1995, Leonard *et al.* 1997).

Uma possível explicação para o aumento da celularidade e dos precursores hematopoiéticos no baço seria à mobilização de células progenitoras da medula óssea (Eng *et al.* 1995, Tare *et al.* 1995, Jackson *et al.* 1995). Diferenças de efeitos causados por IFN- γ em órgãos distintos poderiam explicar a hematopoiese extramedular no baço e hipoplasia na medula óssea. Tare e colaboradores (1995) observaram que camundongos tratados com IL-12 exibem produção de IFN- γ *in vitro* por esplenócitos, mas não por células da medula óssea. IFN- γ produzido por esplenócitos poderia promover mobilização de células da medula em direção ao baço, com regulação positiva de moléculas de adesão (Jackson *et al.* 1995, Yahata *et al.* 1998). Essa hipótese encontra apoio em experimentos realizados por Eng e colaboradores (1995), utilizando camundongos deficientes para o receptor de IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}). Após tratamento com IL-12, esses animais continuam apresentando medula óssea normal.

A presença de figuras apoptóticas observadas nas secções esplênicas dos C3H/Hej injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12, possivelmente, decorre da ação de IL-12 e/ou IFN- γ . Kano e colaboradores (1999) relataram indução de apoptose em cultura de hepatócitos pela ação de IFN- γ , enquanto Zhou e colaboradores (2005) demonstraram que IL-12 regula positivamente a expressão de *Fas* em células tumorais, aumentando a sensibilidade celular à apoptose.

No presente estudo, foi observada linfadenomegalia em camundongos C3H/Hej e C57Bl/6 injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12. Yahata e colaboradores (1998) também relataram linfadenopatia com acúmulo de células NK, CTL e células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ no linfonodo após administração de altas doses de IL-12 murina recombinante. Sarmiento e colaboradores (1994) encontraram aumento generalizado dos linfonodos em macacos injetados com variadas doses de IL-12 humana recombinante, por 14 dias consecutivos.

Aumento na concentração de IFN- γ em amostras plasmáticas obtidas 10 dias após a primeira aplicação de pcDNA3.1-scmu-IL-12 foi encontrado nos animais C3H/Hej e C57Bl/6 utilizados neste trabalho era esperado. Previamente, outros autores relataram aumento da concentração sérica de IFN- γ após a administração de IL-12 ou cDNA codificando IL-12 (Manetti *et al.* 1994, Gately *et al.* 1994, Lasarte *et al.* 1999, Watanabe *et al.* 1999).

Koblish e colaboradores (1998) demonstraram que a IL-12 murina recombinante suprime drasticamente a resposta imune celular em C57Bl/6. Eles demonstraram que altas

doses de IL-12 murina recombinante estimulava a produção de altos níveis de IFN- γ , o qual ativava macrófagos e induzia a atividade da iNOS, gerando óxido nítrico, que inibe a proliferação de linfócitos T frente a estimulação com Con A. No presente trabalho, notou-se aumento no índice de proliferação em animais da linhagem C3H/Hej, mas não da linhagem C57Bl/6, injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12, após estimulação de esplenócitos *in vitro* com Con A. Os níveis plasmáticos de IFN- γ encontrados foram similares nos camundongos C3H/Hej e C57Bl/6, contudo, como não foi realizada avaliação da cinética da produção de IFN- γ , não se pode afastar a possibilidade que logo após a injeção do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 níveis mais elevados de IFN- γ estavam presentes em camundongos C57Bl/6

Os resultados descritos no presente trabalho demonstram o caráter imunogênico das duas proteínas recombinantes de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13, para a espécie canina. A ausência de resposta imune celular ao extrato bruto de *L. chagasi/L. infantum* sugere a necessidade de otimização do uso da citocina IL-12, na forma de plasmídeo, para o estabelecimento de resposta imune celular específica e predominantemente do perfil Th1, com o mínimo de reações adversas.

A administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 em linhagens murinas sensíveis à ação de IL-12 demonstrou, no presente trabalho, a necessidade de cautela no uso desta citocina devido aos efeitos tóxicos observados. Uma alternativa para minimizar os efeitos adversos é o uso de uma pré-dose de IL-12, sete dias antes do tratamento diário, a qual foi relatada por Leonard e colaboradores (1997) como capaz de diminuir a severidade das lesões tóxicas, a concentração de IFN- γ no soro e a produção de IFN- γ por células do linfonodo após estimulação *in vitro* com IL-12.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados no presente estudo, podemos concluir que:

1. As proteínas recombinantes Lc9 e Lc13 da forma amastigota de *Leishmania chagasi*/*L. infantum* estimulam a resposta imune humoral do cão, portanto são imunogênicas para a espécie canina;
2. A imunização de cães com Lc9 e Lc13, nas condições utilizadas, não induziu resposta imune celular;
3. A administração de plasmídeo codificando IL-12 canina em associação a Lc9 e Lc13 no cão, nas condições utilizadas, não modificou a resposta imune induzida;
4. A administração de IL-12 murina na forma de plasmídeo, por eletroporação, induz efeitos sistêmicos nas linhagens C3H/Hej e C57Bl/6 (aumento no tamanho do baço e de linfonodos e bem como aumento na concentração plasmática de IFN- γ);
5. A administração de IL-12 murina na forma de plasmídeo, por eletroporação, induz alterações histológicas esplênicas nos animais da linhagem C3H/Hej, representadas pela hiperplasia da polpa vermelha, aumento do número de megacariócitos, macrófagos vacuolados e corpos apoptóticos;
6. A administração de IL-12 murina na forma de plasmídeo, por eletroporação, promove aumento da capacidade proliferativa dos esplenócitos de animais da linhagem C3H/Hej após estimulação *in vitro* com concanavalina A.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Avaliar a imunogenicidade dos antígenos recombinantes de *L. chagasi/L. infantum*, Lc9 e Lc13, administrados na forma de plasmídeo na espécie canina;
2. Avaliar a imunogenicidade de outros antígenos recombinantes de *L. chagasi/L. infantum*, que já estão sendo purificados em nosso laboratório, administrados na forma de proteína ou plasmídeo, nas espécies murina e canina;
3. Utilizar outras citocinas do perfil T_H1, na forma de plasmídeo, isoladas ou associadas, na tentativa de indução de resposta imune celular T_H1 a antígenos recombinantes co-administrados de *L. chagasi/L. infantum*, nas espécies murina e canina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.** **77**(4): 557-561, 1991.

AFONSO, L.C.C; SCHARTON, T.M.; VIEIRA, L.Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, **263**(5144): 235-237, 1994.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **88**(4): 371-378, 1994.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **59**(1): 53-57, 1998.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**(4):639-649, 1986.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, **106**(4): 315-324, 2002.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; SANTOS, S.O.; CHAGAS-JUNIOR, A.D.; PAIXÃO, M.; AGUIAR, P.H.; dos-SANTOS, W.L., PNTES-DE-CARVALHO, L.C. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.**, **111** (3-4): 251-256, 2006.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. IL-2. Cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. **J. Immunol.**, **145**(3), 831-839, 1990.

BEVERLEY, S.M.; ISMACH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**(2): 484-488, 1987.

BLISS, J.; CLEAVE, V.V.; MURRAY, K.; WIENCIS, A.; KETCHUM, M.; MAYLOR, R.; HAIRE, T.; RESMINI, C.; ABBAS, A.K.; WOLF, S.F. IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. **J. Immunol.**, **156**(3): 888-894, 1996.

BORA, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. **Natl. Med. J. India**, **12**(2): 62-68, 1999.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; da SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonzalo do Amaranto, RN). **Vaccine** **20**(27-28): 3277-3284, 2002.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania*-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **59**(1-2): 21-30, 1997.

BRADLEY, L.M.; DUNCAN, D.D.; YOSHIMOTO, K.; SWAIN, S.L. Memory effectors: a potent IL-4-secreting helper T cell population that develops *in vivo* after restimulation with antigen. **J. Immunol.**, **150**: 3119-3130, 1993.

BRAGA, M.D.M.; COÊLHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**(5): 419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006. 120p.

BROAKYE, D.A.; WILSON, M.D.; KWEKU, M. A review of leishmaniasis in west Africa. **Ghana Med. J.**, **39**(3): 94-97, 2005.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J.C.; THOMSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, **76**(3): 173-180, 1998.

CAR, B.D.; ENG, V.M.; LIPMAN, J.M.; ANDERSON, T.D. The toxicology of interleukin-12: a review. **Toxicol. Pathol.**, **27**(1): 58-63, 1999.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **152**(12): 5949-5956, 1994.

CILLARI, E.; VITALE, G.; ARCOELO, F.; D'AGOSTINO, P. MOCCIARO, G.; GAMBINO, G.; MALTA, R.; STASSI, G.; GIORDANO, C.; MILANO, S.; MANSUETO, S. *In vivo* and *in vitro* cytokines profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. **Cytokines**, **7**(7): 740-745, 1995.

COTTREZ, F.; HURST, S.D.; COFFMAN, R.L.; GROUX, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **J. Immunol.**, **165**(9): 4848-4853, 2000.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULÁLIO, C.; CRISTOVÃO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W.D.Jr, REED, S.G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, **89**(2): 155-158, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Hyg.**, **50**(3): 296-311, 1994.

Da SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; De SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK De SOUSA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonzalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, **19**(9-10): 1082-1092, 2001.

DESJEUX, P. The increase in the risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **95**: 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Urbanization of the leishmaniasis. **Proceedings of the second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Espanha, 2002.**

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, **25**(5): 1240-1242, 1997.

DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, **16**(13): 6127-6145, 1988.

DRAGHIA-AKLI, R.; CUMMINGS, K.K.; KHAN, A.S.; BROWN, P.A.; CARPENTER, R.H. Effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone supplementation in young, healthy Beagle dogs. **J. Anim. Sci.**, **81**(9): 2301-2310, 2003.

DUNAN, S.; FROMMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B.W., CRUZ, A.; QUILICI, M.; THE PHOCEAN VETERINARY STUDY GROUP ON VISCERAL LEISHMANIASIS. Vaccination trial against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **11**(4): 397-402, 1989.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**(2): 125-130, 1996.

ENG, V.M.; CAR, B.D.; SCHNYDER, B.; LORENZ, M.; LUGLI, S.; AGUET, M.; ANDERSON, T.D.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F.J. The stimulatory effects of interleukin (IL)-12 on hematopoiesis are antagonized by IL-12-induced interferon γ in vivo. **J. Exp. Med.**, **181**: 1893-1898, 1995.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; McAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **J. Infect. Diseases**, **166**(5): 1124-1132, 1992.

FEWELL, J.G.; MACLAUGHLIN, F.; MEHTA, V.; GONDO, M.; NICOL, F.; WILSON, E.; SMITH, L.C. Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. **Mol. Ther.**, **3**(4): 574-583, 2001.

FOUNG, S.K.; PERKINS, S. Electric field-induced cell fusion and human monoclonal antibodies. **J. Immunol. Methods**, **116**(1): 117-122, 1989.

FROMMEL, D.; OGUNKOLADE, B.W.; VOULDOUKIS, I.; MONJOUR, L. Vaccine induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, **56**(4): 843-848, 1988.

GATELY, M.K.; WARRIER, R.R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D.M.; FAHERTY, D.A.; CONNAUGHTON, S.E.; ANDERSON, T.D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD, B.R.; MURPHY, M. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN- γ *in vivo*. **Int. Immunol.**, **6**(1): 157-167, 1994.

GASKIN, A.A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M.; LEVY, M.; STEUER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B.C.; AHN, A.; BREITSCHWERDT, E.B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. **J. Vet. Intern. Med.**, **16**(1): 34-44, 2002.

GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.A.; KUBIN, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. IL-12 enhances Th1-Type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, **154**(9): 4623-4629, 1995.

GHERARDI, M.M.; RAMÍREZ, J.C.; ESTEBAN, M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 Env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. **J. Virol.**, **74**(14): 6278-6286, 2000.

GONZALO, R.M.; RODRÍGUEZ, J.R. RODRIGUÉZ, D.; GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. **Microbes Infect.**, **3**(9): 701-711, 2001.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L., ORSINI, S. Decreased sensitivity of meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **86**(6): 613-620, 1992.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet. Parasitol.**, **100**(1-2): 87-103, 2001.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**(6): 687-725, 1989.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, **35**(11-12): 1169-1180, 2005.

GRØNEVIK, E.; TOLLEFSEN, S.; SIKKELAND, L.I.B.; HAUG, T.; TJELLE, T.E.; MATHIESEN, I. DNA transfection of mononuclear cells in muscle tissue. **J. Gene Med.**, **5**(10): 909-917, 2003.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M.J.; PERIBÁÑEZ, M.A.; CASTILLO, J.A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopath.** **88**(1-2): 13-20, 2002.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infect. Dis.**, **2**(8): 494-501, 2002.

HELLER, R.; GRASSO, R.J. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion *in vivo*. **Biochim. Biophys. Acta**, **1024**: 185-188, 1989.

HOFSTRA, C.L.; VAN ARK, I.; HOFMAN, G.; KOOL, M.; NIJIKAMP, F.P.; VAN OOSTERHOUT, A.J. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia and serum IgE levels. **J. Immunol.**, **161**(9): 5054-5060, 1998.

HSIEH, C-S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F. O'GARRA, A. MURPHY, K.M. Development of Th1 CD4+ cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, **260**(5107): 547-549, 1993.

IMBODEN, M.; SHI, F.; PUGH, T.D.; FREUD, A.G.; THOM, N.J.; HANK, J.A.; HAO, Z.; STAELIN, S.T.; SONDEL, P.M.; MAHVI, D.M. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. **Hum. Gene Ther.**, **14**(11): 1037-1048, 2003.

JACKSON, J.D.; YAN, Y.; BRUNDA, M.J.; KELSEY, L.S.; TALMADGE, J.E. Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis *in vivo*. **Blood**, **85**(9): 2371-2376, 1995.

JAROSZESKI, M.J.; GILBERT, R.; FALLON, P.G.; HELLER, R. Mechanically facilitated cell-cell electrofusion. **Biophys. J.**, **67**(4): 1574-1581, 1994.

JEANNIN, P.; DELNESTE, Y.; LIFE, P.; GAUCHAT, J.-F.; KAISERLIAN, D.; BONNEGUY, J.-Y. Interleukin-12 increases interleukin-4 production by established human Th0 and Th2-like T cell clones. **Eur. J. Immunol.** **25**(8): 2247-2252, 1995.

KANO, A.; HARUYAMA, T.; AKAIKE, T.; WATANABLE, Y. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, **257**(3): 672-677, 1999.

KEMP M, HEY AS, KURTZHALS JA, CHRISTENSEN CB, GAAFAR A, MUSTAFA MD, KORDOFANI AA, ISMAIL A, KHARAZMI A, THEANDER TG. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **196**(3): 410-5, 1994.

KEMP M, THEANDER TG, KHARAZMI A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunol Today**, **17**(1):13-16, 1996.

KENNEY, R.T.; SACKS, D.L.; SYPEK, J.P.; VILELA, L.; GAM, A.A.; EVANS-DAVIS, K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **163**(8): 4481-4488, 1999.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.L.; EL-HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, **65**(1-2): 105-108, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; PINELLI, E.; DEL REAL, G.; MOLINA, R.; VITUTIA, M.M.; CAÑAVATE, M.C.; NIETO, J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, **1**(4): 311-318, 1995.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, **17**: 279-289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. **Proceedings of the second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Espanha, 2002.**

KOBLISH, H.K.; HUNTER, C.A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; LEE, W.M.F. Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon γ induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. **J. Exper. Med.**, **188**(9): 1603-1610, 1998.

KREUTZER, R.D.; SOURATY, N.; SEMKO, M.E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **36**(1): 22-32, 1987.

KURATA, K.; IWATA, A.; MASUDA, K.; SAKAGUCHI, M.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences that induce IFN- γ production in canine peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopath.**, **102**(4): 441-450, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**(5259):680-685, 1970.

LAINSON, R.; RANGEL, E.L. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American Visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **100**(8): 811-827, 2005.

LASARTE, J.J.; CORRALES, F.J.; CASARES, N.; CERIO, A.L-D.; QIAN, C.; XIE, X.; BORRÁS-CUESTA, F.; PRIETO, J. Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. **J. Immunol.**, **162**(9): 5270-5277, 1999.

LASRI, S.; SAHIBI, H.; SADAK, A.; JAFFE, C.L.; RHALEM, A. Immune response in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. **Vet. Res.**, **30**(5): 441-49, 1999.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G.M., CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RIÇA CAPELA, M.J., ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopath.**, **79**(3-4): 273-284, 2001.

LEONARD, J.P.; SHERMAN, M.L.; FISHER, G.L.; BUCHANAN, L.J.; LARSEN, G.; ATKINS, M.B.; SOSMAN, J.A.; DUTCHER, J.P.; VOGELZANG, N.J.; RYAN, J.L. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon- γ production. **Blood**, **90**(7): 2541-2548, 1997.

LECHARDEUR, D.; SOHN, K-J, HAARDT, M.; JOSHI, P.B.; MONCK, M.; GRAHAM, R.W.; BEATTY, B.; SQUIRE, J.; O'BRODOVICH, H.; LUKACS, G.L. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. **Gene Ther.**, **6**(4): 482-497, 1999.

LEMESRE, J-L.; HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; GONÇALVES, R.B.; HOTTIN, G.; PAPIEROK, G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, **23**(22): 2825-2840, 2005.

LUCAS, M.L.; HELLER, R. Immunomodulation by electrically enhanced delivery of DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. **Mol. Ther.**, **3**(1): 47-53, 2001.

LUI, V.W.Y.; FALO Jr, L.D.; HUANG, L. Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression *in vivo*. **J. Gene Med.**, **3**(4): 384-393, 2001.

LUKACS, G.L.; HAGGIE, P.; SEKSEK, O.; LECHARDEUR, D.; FREEDMAN, N.; VERMAN, A.S. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. **J. Biol. Chem.**, **275**(3): 1625-1629, 2000.

MA, X.; D'ANDREA, A.; KUBIN, M.; ASTE-AMEZAGA, M.; SARTORI, A.; MONTEIRO, J.; SHOWE, L.; WYSOCKA, M. TRINCHIERI, G. Production of interleukin-12. **Res. Immunol.** **146**: 432-438, 1995.

MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.G.; PICCINNI, M-P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) induces Th1-type specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. **J. Exp. Med.** **177**(4): 1199-1204, 1993.

MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.; PICCINNI, M-P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S; TRINCHIERI, G. Interleukin 12 induces stable priming for interferon γ (IFN- γ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- γ production in established Th2 cells clones. **J. Exp. Med.** **179**(4): 1273-1283, 1994.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, **119**(Pt 3):237-246, 1999.

MELKONYAN, H.; SORG, C.; KLEMPT, M. Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). **Nucleic Acids Res.**, **24**(21): 4356-4357, 1996.

MOGNEAU, E.; ALTARE, F.; WAKIL, A.E.; ZHENG, C.; COPPOLA, T.; WANG, Z.; WALDMANN, R.; LOCKSLEY, R.M.; GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective Leishman antigen. **Science**, **268**(5210): 563-566, 1995.

MOLL, H. Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cell internalizes *Leishmania major* and induce an antigen-specific T-cell responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **329**: 587-592, 1993.

MOMAN, H.; GRIMALD, G. Jr.; DEANE, L.M. *Leishmania infantum*, the aetiologic agent of American visceral leishmaniasis (AVL). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 447-448, 1987.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immun. Immunopath.**, **71**(3-4): 181-195, 1999.

MORENO, J; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, **18**(9): 399-405, 2002.

MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; ADAMOVICZ, J.J.; GAUSE, W.C.; HUBBARD, B.R.; GATELY, M.K.; FINKELMAN, F.D. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. **J. Immunol.**, **152**(3): 1047-1056, 1994.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **49**(1): 68-75, 1993.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** **7**: 145-173, 1989.

MURAILE, E.; TREZ, C.D.; PAJAK, B.; TORRENTERA, F.A.; BAETSELIER, P.D.; LEO, O.; CARLIER, Y. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **71**(5): 2704-2715, 2003.

NEUMANN, E.; KAKORIN, S.; TOENSING, K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. **Bioelectrochem. Bioenerg.** **48**(1): 3-16, 1999.

NOORMOHAMMADI, A.H.; HOCHREIN, H.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M.; HANDMAN, E. Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. **Vaccine**, **19**(28-29): 4043-4052, 2001.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MACWILLIAM, A. A. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. Canadian Council on Animal Care, 1993.

OLIVEIRA MENDES, C.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P.; MARIA MELO BATISTA, L.; APARECIDA DOS SANTOS, M.; ELLNER PARRA, L.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**, **21**(19-20): 2589-2597, 2003.

OGUNKOLADE, B.W.; VOULDOUKIS, I.; FROMMEL, D.; DAVOUST, B.; RHODES-FEUILLETTE, A.; MONJOUR, L. Immunization of dogs with a *Leishmania infantum*-derived vaccine. **Vet. Parasitol.**, **28**(1-2): 33-41, 1988.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** **219**(8): 1076-1083, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, **55**(1): 39-44, 1996.

PEREZ, V.L.; LEDERER, J.A.; LICHTMAN, A.H.; ABBAS, A.K. Stability of Th1 and Th2 populations. **Int. Immunol.**, **7**(5): 869-875, 1995.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, E.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, **62**(1): 229-235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, **25**(6): 1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITTENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, **92**(3): 181-189, 2000.

POWRIE, F.; MENON, S.; COFFMAN, R.L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. **Eur. J. Immunol.**, **23**(11): 2223-2229, 1993.

RAMIRO, M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologus prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine** **21**(19-20): 2474-2484, 2003.

REMPEL, J.D.; WANG, M.; HAYGLASS, K.T. In vivo IL-12 administration induces profound but transient commitment to T helper cell type 1-associated patterns of cytokine and antibody production. **J. Immunol.**, **159**(3): 1490-1496, 1997.

REY, L.C.; MARTINS, C.V.; RIBEIRO, H.B.; LIMA, A.A.M. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children an endemic area. **J. Pediatr.**, **81**(1), 73-78, 2005.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, **81**(3): 173-184, 1999.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**(1): 143-148, 1998.

SALDARRIAGA, O.A.; TRAVI, B.L.; PARK, W.; PEREZ, L.E.; MELBY, P.C. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. **Vaccine**, **24**(11): 1928-1940, 2006.

RITTIG, M.G.; BOGDAN, G. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, **16**(7): 292-297, 2000.

SARMIENTO, U.M.; RILEY, J.H.; KNAACK, P.A.; LIPMAN, J.M.; BECKER, J.M.; GATELY, M.K.; CHIZZONITE, R.; ANDERSON, T.D. Biologic effects of recombinant human interleukin-12 in squirrel monkeys (*Sciureus saimiri*). **Lab. Invest.**, **71**(6): 862-873, 1994.

SANTOS, W.R.; De SOUZA, E.P., PALATNIK, M.; PALATNIK De SOUSA, C.B. Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, **17**(20-21): 2554-2561, 1999.

SANTOS, W.R.; De LIMA, V.M.F.; De SOUZA, E.P., BERNARDO, R.R., PALATNIK, M.; PALATNIK De SOUSA, C.B. Saponins, IL-12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, **21**(1-2): 30-43, 2002.

DOS SANTOS, L.R.; BARROUIN-MELO, S.M.; CHANG, Y.F.; OLSEN, J.; MCDONOUGH, S.P.; QUIMBY, F.; DOS SANTOS, W.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA, G.G. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.**, **98**(1-2): 43-48, 2004.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. IL-12 as an adjuvant for cell-mediated immunity. **Semin. Immun.**, **9**(5): 285-291, 1997.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**(6): 671-683, 1996.

SHI, F.; RAKHMILEVICH, L.; HEISE, C.P.; OSHIKAWA, K.; SONDEL, P.M.; YANG, N-S.; MAHVI, D.M. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in

complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. **Mol. Cancer Ther.**, **1**(11): 949-957, 2002.

SJÖLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 Immune Response and Simultaneous Lack of Activation of a Th2 Response Are Required for Generation of Immunity to Leishmaniasis. **J. Immunol.**, **160**(8): 3949–3957, 1998.

SOMIARI, S.; GLASSPOOL-MAOLNE, J.; DRABICK, J.J.; GILBERT, R.A.; HELLER, R.; JAROSZESKI, M.J.; MALONE, R.W. Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery. **Mol. Ther.**, **2**(3): 178-187, 2000.

SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis: A randomized clinical trial. **Vet. Q.**, **19**(1): 10-13, 1997.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D.L.; GLAICHENHAUS, N.; WU, C-Y.; SEDER, R.A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells *in vivo*: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, **97**(15): 8427-8432, 2000.

TAKETO, A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. **Biochim. Biophys. Acta**, **949**(3): 318-324, 1988.

TARE, N.S.; BOWEN, S.; WARRIER, R.R.; CARVAJAL, D.M.; BENJAMIN, W.R.; RILEY, J.H.; ANDERSON, T.D.; GATELY, M.K. Administration of recombinant interleukin-12 to mice suppresses hematopoiesis in the bone marrow but enhances hematopoiesis in the spleen. **J. Interf. Cytok. Res**, **15**: 377-383, 1995.

TEIXIERA, M.C.; OLIVEIRA, G.G.; SILVANY, M.A.; ALCÂNTARA-NEVES, N.M.; SOARES, M.B.; RIBEIRO-Dos-SANTOS, R.; JERÔNIMO, S.M.; COSTA, C.H.; Dos-SANTOS, W.L.; EICHINGER, D.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, **25**(1): 51-54, 2007.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**(3): 287-292, 1995.

TRINCHIERI, G.; SCOT, P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol** **146**(7-8): 423-431, 1995.

TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; UNANE, E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl Acad. Sci USA**, **90**(8): 3725-3729, 1993.

TUSZYNSKI, G.P.; WARREN, L. Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. **Anal Biochem.** **67**(1):55-65, 1995.

WATANABE, M.; FENTON, R.G.; WIGGINTON, J.M.; McCORMICK, K.L.; VOLKER, K.M.; FOGLER, W.E.; ROESSLER, P.G.; WILTROUT, R.H. Intradermal delivery of IL-12 naked DNA induces systemic NK cell activation and Th1 response in vivo that is independent of endogenous IL-12 production. **J. Immunol.**, **163**(4): 1943-1950, 1999.

WEBER, S.M.; QI, C.; NEAL, Z.; SONDEL, P.; MAHVI, D.M. IL-12 cDNA direct injection: antimetastatic effect from a single injection in a murine hepatic metastases model. **J. Surg. Res.**, **122**(2): 210-217, 2004.

WHO Expert Committee. Control of the leishmaniasis **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, **793**, Geneva, Suíça, 1-14, 1990.

World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>, acesso em 08/02/2007.

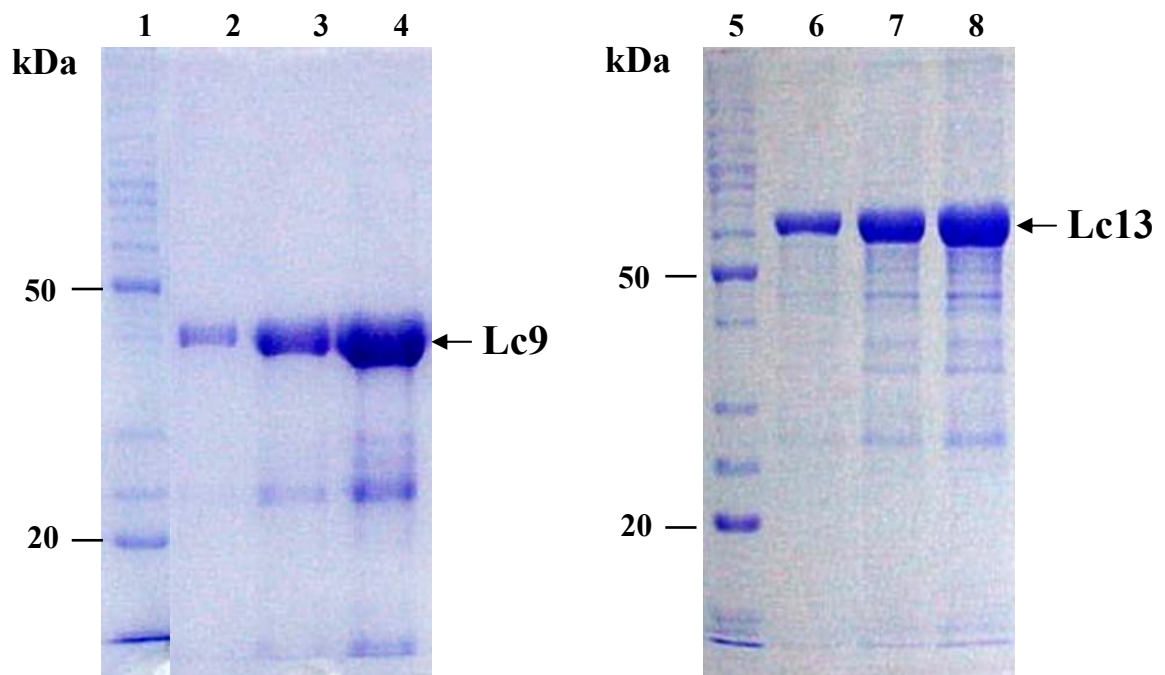
YAHATA, T.; WATANABE, K.; OHTA, A.; OHMI, Y.; SATO, N.; SANTA, K.; ABE, N.; IWAKABE, K.; KANEKO, S.; SUZUKI, N.; HABU, S.; YASUDA, S.; NISHIMURA, T. Accumulation of IL-12-activated antitumor effector cells into lymph nodes of tumor-bearing mice. **Immunol. Lett.**, **61**(2-3): 127-133, 1998.

YAMAKAMI K, AKAO S, SATO M, NITTA Y, MIYAZAKI J, TADAKUMA T. A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection. **Parasitol Int.**, **50**(2): 81-91, 2001.

ZIMMERMANN, S.; EGETER, O.; HAUSMANN, S.; LIPFORD, G.B.; RÖCKEN, M.; WAGNER, H.; HEEG, K. Cutting edge: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. **J Immunol**, **160**(8): 3627-3630, 1998.

ZHOU, Z.; LAFLEUR, E.A.; KOSHKINA, N.V.; WORTH, L.L.; LESTER, M.S.; KLEINERMAN, E.S. Interleukin-12 up-regulates Fas expression in human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells by enhancing its promoter activity. **Mol. Cancer Res**, **3**(12): 685-691, 2005.

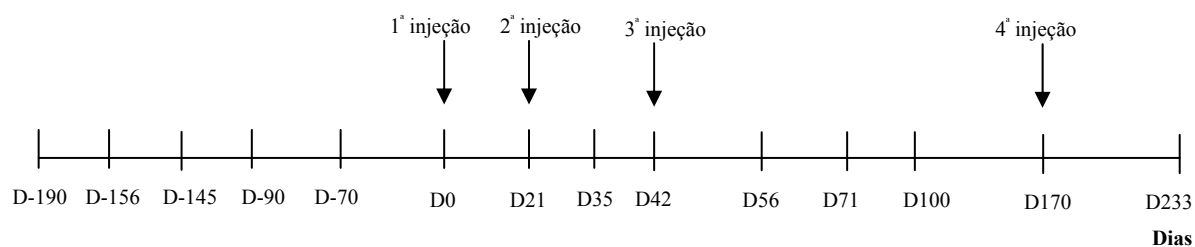
Anexo 1. Purificação das proteínas recombinantes de *L. chagasi*/*L. infantum*, Lc9 e Lc13, através de SDS-PAGE. Para a análise de Lc9 e Lc13 foram elaborados géis de separação de poliacrilamida a 10 e 8,5%, respectivamente, e sistema de tampão com gradiente descontínuo (Laemmli 1970). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado por azul de Coomassie. Raias: 1 e 5 - marcadores de peso molecular; 2, 3 e 4 - Lc9 (39 kDa); 6, 7 e 8 - Lc13 (66 kDa).



Anexo 2. Densidades ópticas obtidas no ELISA para avaliação de anticorpos IgG reativos a extrato total e antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*/*L. infantum* (Lc9 e Lc13) em cães injetados com 1 mg de saponina em salina (**Salina**); 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13 e 1 mg de saponina em salina (**Lc9/Lc13**); 200 µg de Lc9, 200 µg de Lc13 e 1 mg de saponina em salina e 800 µg de plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 (**Lc9/Lc13/pIL-12**), e os controles positivos e negativos (ver Material e Métodos), antes e após a segunda e terceira imunizações.

Grupos	Animais	Antes da imunização			Após 2ª imunização			Após a 3ª imunização		
		Ag	Lc9	Lc13	Ag	Lc9	Lc13	Ag	Lc9	Lc13
Salina	S1	0,320	0,782	0,863	0,470	0,966	0,773	0,411	0,265	0,457
	S2	0,288	0,255	0,340	0,279	0,455	0,511	0,708	0,209	0,451
	S3	0,141	1,415	0,793	0,720	1,868	0,744	0,791	0,540	0,476
Lc9/Lc13	A1	0,331	0,474	0,638	2,633	2,804	2,016	2,702	1,587	1,568
	A2	0,206	0,582	0,504	2,504	2,797	1,730	2,605	1,397	1,444
	A3	0,304	0,311	0,315	2,578	2,806	1,846	2,699	1,552	1,475
	A4	0,331	0,325	0,609	2,418	2,815	1,934	2,634	1,564	1,592
Lc9/Lc13/ pIL-12	P1	0,215	0,720	1,350	2,454	2,604	1,831	2,333	1,530	1,606
	P2	0,564	1,289	1,302	2,608	2,848	1,988	2,360	1,448	1,430
	P3	0,380	0,767	0,691	2,531	2,795	2,005	2,729	1,518	1,571
Controles										
Negativos	C1	0,167	0,378	0,187	0,237	0,454	0,422	0,216	0,090	0,166
	C2	0,153	0,236	0,822	0,198	0,520	0,822	0,300	0,152	0,440
	C3	0,277	0,175	0,422	0,336	0,332	0,368	0,515	0,139	0,304
	C4	0,190	0,159	0,368	0,229	0,286	0,187	0,395	0,215	0,123
Positivos	151J	1,658	1,680	1,147	2,453	2,625	1,147	2,188	1,320	0,896
	Pool	1,021	0,168	0,164	1,130	0,252	0,164	1,134	0,081	0,121

Anexo 3. Cronograma do experimento realizado em cães mestiços adultos com idade variando entre 4 e 9 anos, de ambos os sexos provenientes dos municípios de Salvador, Lauro de Freitas e Dias D'Ávila – Bahia.



D-190: Realização de orquiepididectomia.

D-156, D71 e D233: Realização de ensaios para avaliar a resposta linfoproliferativa após estímulo *in vitro* com extrato bruto e antígenos recombinantes (Lc9 e Lc13) de *L. chagasi/L. infantum*.

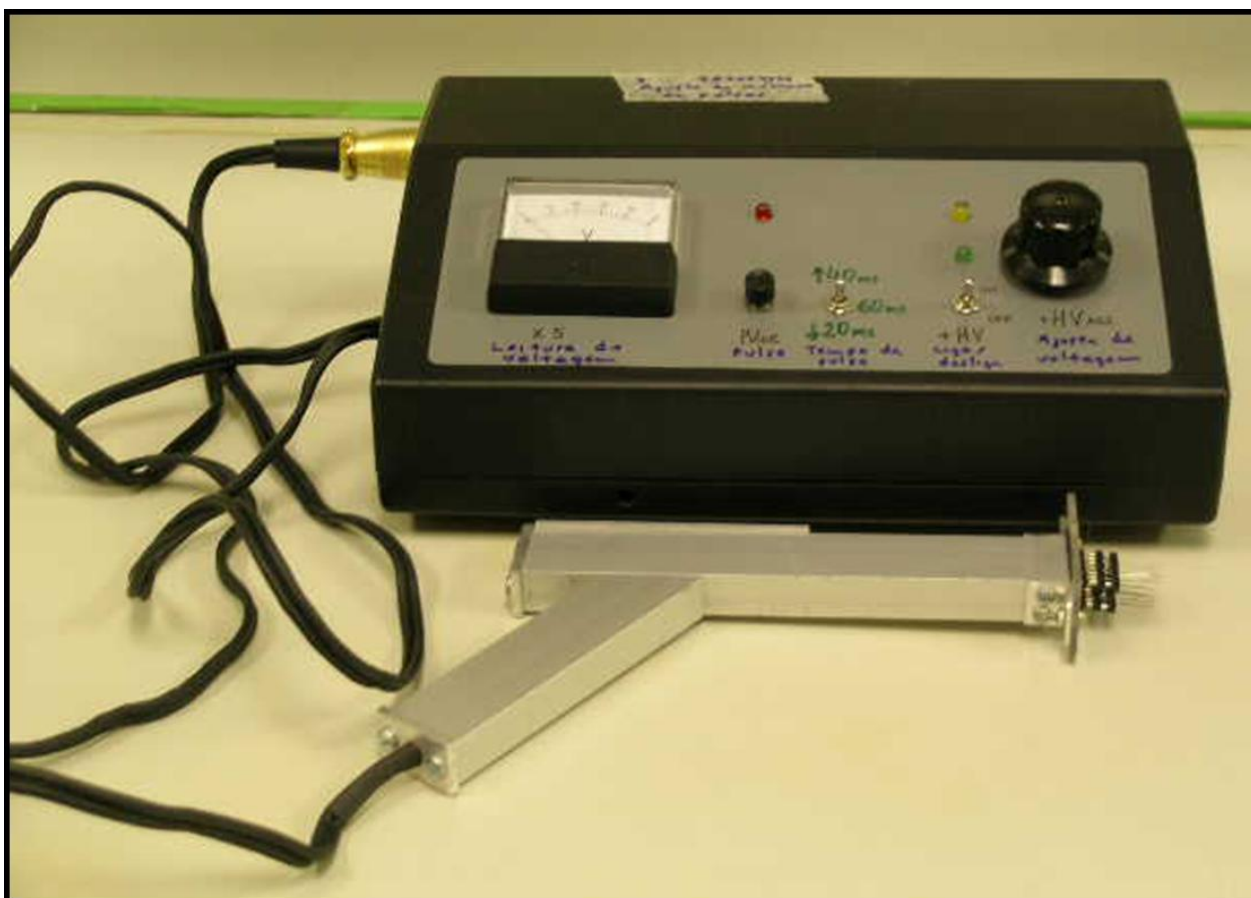
D-145, D35 e D56: Realização de ensaio imunoenzimático (ELISA) para mensuração de anticorpos reativos a extrato bruto e antígenos recombinantes (Lc9 e Lc13) de *L. chagasi/L. infantum*.

D-90: Utilização de ecto e endoparasiticidas e vacinação dos cães.

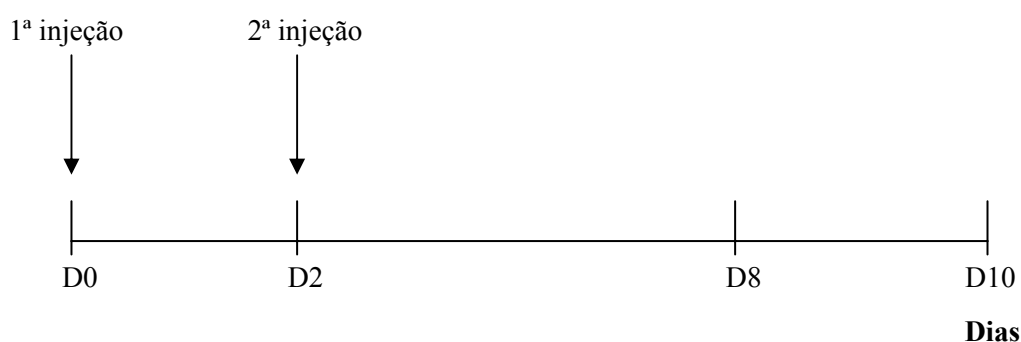
D-70: Realização de hemograma, parasitológico de fezes, urinálise, dosagem de uréia sérica e punção aspirativa esplênica seguida de cultura *in vitro*.

D100: Avaliação da produção de IFN- γ em sobrenadante de CMNSP estimuladas *in vitro* com extrato bruto de *L. chagasi/L. infantum*.

Anexo 4. Eletroporador utilizado na administração de salina, plasmídeo sem inserto (pcDNA3.1) e com inserto de IL-12 murina de cadeia única (pcDNA3.1-scmu-IL-12) em camundongos das linhagens C3H/HeJ e C57Bl/6. O aparelho foi projetado e construído pelo Dr. Yuri Pepe, Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia (ver Material e Métodos).



Anexo 5. Cronograma do experimento realizado em camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6, com 9 a 16 semanas de idade, de ambos os sexos, obtidos e mantidos no biotério do CPqGM – Fiocruz, Salvador – Bahia.



D0 e D2: Administração de salina, plasmídeo sem inserto (pcDNA3.1) ou plasmídeo codificando IL-12 murina de cadeia única, com ou sem eletroporação (ver Material e Métodos).

D8: Realização de hemograma.

D10: Sacrifício dos camundongos, determinação do peso corpóreo e de órgãos, avaliação da capacidade proliferativa de esplenócitos após estímulo *in vitro* com mitógeno Con A, obtenção de plasma para determinação da concentração de IFN- γ e fixação de fragmentos esplênicos em formalina 10%.

Anexo 6. Valores de hematócrito, número de hemácias e concentração de hemoglobina ($X \pm SD$) em camundongos das linhagens C3H/Hej e C57Bl/6, obtidos oito dias após a primeira injeção com salina (grupo E-Salina EL), plasmídeo vazio (E-pVazio EL) e plasmídeo codificando IL-12 murina por eletroporação (E-pIL-12 EL) ou sem eletroporação (E-pIL-12 EL).

Grupo	Hematócrito (%)	Nº de Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)
C3H/Hej			
E-pVazio EL	$42,9 \pm 1,5$	$8,4 \pm 0,2$	$14,6 \pm 0,7$
E-pIL-12 EL	$40,5 \pm 2,6$	$7,8 \pm 0,5$	$14,4 \pm 0,8$
C57Bl/6			
E-Salina EL	$38,4 \pm 2,7$	$8,5 \pm 0,6$	$13,3 \pm 1,0$
E-pVazio EL	$39,3 \pm 1,2$	$8,8 \pm 0,3$	$13,8 \pm 0,6$
E-pIL-12 EL	$37,3 \pm 2,6$	$8,4 \pm 0,6$	$13,2 \pm 0,9$
E-pIL-12	$39,3 \pm 1,1$	$8,7 \pm 0,3$	$13,7 \pm 0,3$