



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



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/c  
IMUNIZADOS COM UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE  
*Leishmania chagasi* (Lc9), SAPONINA E INTERLEUCINA-12  
(IL-12)**

**CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO**

**Salvador-Bahia  
2007**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/c  
IMUNIZADOS COM UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE  
*Leishmania chagasi* (Lc9), SAPONINA E INTERLEUCINA-12  
(IL-12)**

**CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO**

**ORIENTADOR: DR. GERALDO GILENO DE SÁ OLIVEIRA**

**CO-ORIENTADOR: DR. LAIN CARLOS PONTES DE CARVALHO**

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-graduação em Imunologia  
da Universidade Federal da Bahia  
para obtenção do grau de Mestre  
em Imunologia

**Salvador-Bahia  
2007**

**RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/c  
IMUNIZADOS COM UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE  
*Leishmania chagasi* (Lc9), SAPONINA E INTERLEUCINA-12  
(IL-12)**

**CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dra. Cláudia Ida Brodskyn – Pesquisador Titular – CPqGM-FIOCRUZ/BA

---

Dr. Roberto José Meyer Nascimento – Professor da Pós-graduação em Imunologia - UFBA

---

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira – Pesquisador Associado – CPqGM-FIOCRUZ/BA - Orientador

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos e amados pais, meus exemplos de vida.

A Marcelo e a minha princesinha, razão do meu viver.

As minhas irmãs queridas, minhas melhores amigas.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Geraldo, pela sua dedicação e orientação durante todo trabalho, estando sempre disposto a ajudar e passar um pouco do seu imenso conhecimento e experiência.

Ao pesquisador, Lain, pelas discussões, sugestões e incentivo para o presente trabalho.

Aos amigos, Lenita e Ricardo, pelo apoio, discussões, orientação, sem contar com a enorme carga horária dedicada para realização deste trabalho.

À Livia, pela sua preciosa ajuda em todos os momentos necessários.

À minha equipe de trabalho, Patrícia, Andréa, Livia, Lenita, Ricardo e Raimundo, por terem me dado o prazer de trabalhar em equipe.

A todos meus colegas de laboratório (LPBI), em especial a Virgínia e Micely pelo apoio e incentivo. A Thiago e Kellyane que dedicaram seu precioso tempo na correção da dissertação.

As minhas queridas amigas Paulinha, Adriana, Cristiane, Mariana e Soraia pela amizade que sempre me confortou nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelos ensinamentos obtidos em suas disciplinas.

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos, cunhados, tios e tias, sogro e sogra pela compreensão nos meus momentos de ausência e que, com seu carinho e convívio, contribuíram para mais essa conquista em minha vida.

## RESUMO

RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM UM ANTÍGENO RECOMBINANTE DE *Leishmania chagasi* (Lc9), SAPONINA E INTERLEUCINA-12 (IL-12). **CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO.** Em um estudo prévio, cinco antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* foram selecionados, através de soro de cão, para avaliação como candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. Um desses antígenos, denominado Lc9, foi posteriormente utilizado isoladamente ou em combinação com diversos adjuvantes para imunizar camundongos. Após a injeção de Lc9 isoladamente ou em associação com saponina ocorreu indução de resposta imune do tipo Th2 ou mista (Th1/Th2), respectivamente. Interleucina-12 é uma citocina que pode promover o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1 a antígenos co-administrados. No presente trabalho, visando uma modificação adicional da resposta imune a Lc9, de Th1/Th2 para Th1, camundongos foram injetados com um plasmídeo codificando IL-12 murina (pcDNA3.1-scmu-IL-12) durante a sensibilização realizada com Lc9 e saponina. Grupos de camundongos BALB/c foram submetidos a três séries de injeções, com 21 dias entre cada duas séries consecutivas, por via subcutânea, com salina (G1), saponina em salina (G2), Lc9-saponina (G3). Durante a primeira série de injeções, os animais receberam 50 µg pcDNA3.1 vazio (G4) ou 50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) e 0,4 µg (G8) de pcDNA3.1-scmuIL-12, por via intramuscular seguida de eletroporação. A resposta imune humoral foi avaliada pela mensuração dos níveis de anticorpos em amostras de soro. A resposta celular foi avaliada por ensaio de linfoproliferação e produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5) por esplenócitos, estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania*. Todos os grupos de animais que receberam Lc9 produziram anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a reativos ao antígeno recombinante Lc9. Nenhum dos grupos apresentou resposta linfoproliferativa significativa. Contudo, os grupos (G3 a G7) produziram e todos os grupos que receberam Lc9 (G3 a G8) produziram IL-5. Além disso, apenas os grupos G4 e G8 apresentaram níveis elevados de produção de IL-4. Esses resultados sugerem que camundongos imunizados com Lc9 e saponina desenvolvem uma resposta mista Th1/Th2, e que, nenhuma das doses de plasmídeo codificando IL-12 é capaz de modificar a resposta imune para tipo Th1.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, antígeno recombinante, interleucina-12, imunização

**ABSTRACT**

IMMUNE RESPONSE IN BALB/c MOUSE IMMUNIZED WITH *Leishmania chagasi* (Lc9) RECOMBINANT ANTIGEN, SAPONIN AND INTERLEUKIN-12 (IL-12). **CRISTIANE GARBOGGINI MELO DE PINHEIRO.** In a previous study, five *Leishmania chagasi* recombinant antigens were selected as potential candidates for a canine vaccine against visceral leishmaniasis. One of these antigens, named Lc9, was injected in mice associated with different adjuvants. Mice that were injected with the Lc9 antigen alone or Lc9-saponin induced a Th2 or mixed Th1/Th2 immune response, respectively. Interleukin-12 is a cytokine able to induce a Th1 immune response to co-administrated antigens. In this work, aiming to assess an additional modification of the immune response to Lc9, from Th1/Th2 to Th1, groups of BALB/c mice were injected with a plasmid encoding murine IL-12 (pcDNA3.1-scmu-IL-12) during Lc9-saponin treatment. The animals received three injection series at 21-day intervals with saline (G1), saponin in saline (G2) and Lc9-saponin (G3). In the first serie of injections, a single dose of an empty plasmid (pcDNA3.1) (G4) or different amounts 50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) or 0,4 µg (G8) of a plasmid encoding single-chain murine IL-12 (pcDNA3.1-scmu-IL-12) was administered. The plasmid DNA was injected intramuscularly, followed by electroporation while saline, saponin in saline and Lc9 were injected subcutaneously. After treatment, specific IgG, IgG1, IgG2a antibodies reactive to Lc9 were measured by ELISA. The cellular immune response was assessed by lymphoproliferative response and cytokine production. All groups that were injected with Lc9 developed specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies reactive to recombinant antigen Lc9. Neither of the groups had a significant lymphoproliferative response. However, the production of IFN- $\gamma$  was observed in the groups (G3 to G7) and IL-5 in all groups that received Lc9 (G3 to G8). Moreover, only G4 and G8 groups presented high IL-4 production. These results suggest that mice that were injected with Lc9-saponin develop a mixed Th1/Th2 response. Nevertheless, administration of a plasmid encoding murine IL-12, whatever amount used, do not change the immune response to Th1 type.

Keywords: Visceral leishmaniasis, recombinant antigen, interleukin-12, immunization

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|               |   |
|---------------|---|
| DMSO          | Dimetilsufóxido   |
| cDNA          | Ácido desoxirribonucleico complementar                    |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| CpG           | Citosina-fosfato-guanosina                                |
| Con A         | Concanavalina A   |
| D.O.          | Densidade Óptica  |
| ELISA         | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>                  |
| GM-CSF        | Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gama   |
| Ig            | Imunoglobulina  |
| IL            | Interleucina  |
| IPTG          | Isopropil- $\beta$ -D-thiogalactosídeo                    |
| HEPES         | Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano- sulfônico     |
| LB            | Luria Bertani   |
| LV            | Leishmaniose Visceral                                     |
| NK            | <i>Natural Killer</i>                                     |
| RPMI 1640     | Meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial              |
| SBF           | Soro Bovino Fetal   |



|               |   |
|---------------|---|
| SDS-PAGE      | <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| Th            | <i>T helper</i>   |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa                                     |
| TMB           | Tetrametilbenzidina   |
| NCBI          | <i>National Center for Biotechnology Information</i>              |
| PBS           | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                                  |
| SNK           | <i>Student Newman Keuls</i>                                       |

## SUMÁRIO

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| RESUMO.....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| ABSTRACT.....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA .....   | 12                                   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 15                                   |
| 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL .....  | 15                                   |
| 2.1.1 Considerações gerais sobre a leishmaniose visceral.....  | 15                                   |
| 2.1.3 Aspectos gerais da imunidade contra protozoários do complexo <i>Leishmania donovani</i> .....                                  | 18                                   |
| 2.2 O uso da interleucina-12 como agente modulador da resposta imune contra a <i>Leishmania</i> .....                                | 21                                   |
| 3.1 Objetivo Geral.....  | 24                                   |
| 3.2 Objetivos Específicos .....  | 24                                   |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 25                                   |
| 4.1. Antígenos .....   | 25                                   |
| 4.1.1 Obtenção de lisado de <i>Leishmania chagasi</i> .....  | 25                                   |
| 4.1.2 Obtenção do antígeno recombinante de <i>Leishmania chagasi</i> (Lc9).....  | 26                                   |
| 4.1.2.3. Purificação da proteína recombinante Lc9 por cromatografia de afinidade .....   | 27                                   |
| 4.2. Obtenção do plasmídeo codificando IL-12 murina de cadeia única.....   | 28                                   |
| 4.3 Animais.....   | 29                                   |
| 4.4 Injeção de camundongos com Lc9-saponina e pcDNA3.1-scmu-IL-12.....   | 29                                   |
| 4.5 Avaliação da resposta imune humoral .....  | 30                                   |
| 4.5.1 ELISA para mensuração de anticorpos da classe IgG reativos com Lc9 .....   | 30                                   |
| 4.5.2. ELISA para mensuração de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG1 reativos com Lc9 .....  | 31                                   |
| 4.6 Avaliação da resposta imune celular.....   | 32                                   |
| 4.6.1 Ensaio de linfoproliferação.....   | 32                                   |
| 4.6.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5) por esplenócitos através do método ELISA .....                | 33                                   |
| 4.7 Avaliação de possíveis efeitos tóxicos resultantes da administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação.....                | 35                                   |
| 5. RESULTADOS .....  | 37                                   |
| 5.1. Avaliação da proteína recombinante de <i>L. chagasi</i> (Lc9) purificada .....  | 37                                   |
| 5.2. Avaliação de plasmídeos pcDNA3.1 e pcDNA3.1-scmuIL-12 purificados.....  | 38                                   |
| 5.3. Avaliação da resposta imune .....   | 39                                   |
| A resposta imune humoral e celular foram avaliadas 10 dias e quatro semanas após a terceira série de injeções, respectivamente. .... | 39                                   |
| 5.3.1 Avaliação da resposta imune humoral específica.....  | 39                                   |
| 5.3.1.1 Avaliação da produção de anticorpos IgG e subclasses IgG2a e IgG1 reativos a Lc9 .....                                       | 39                                   |
| 5.3.2. Avaliação da resposta imune celular.....  | 43                                   |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.2.1 Ensaio de linfoproliferação .....   | 43 |
| 5.4. Avaliação de efeitos da administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação ..... | 50 |
| 6. DISCUSSÃO .....  | 52 |
| 7. CONCLUSÕES .....   | 60 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 61 |

## 1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave das leishmanioses, é causada, na maioria das vezes, por uma das seguintes espécies: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON *et al.*, 1987).

Epidemiologicamente, a LV pode ser classificada em dois tipos que são denominados antroponótico e zoonótico. A LV do tipo zoonótico é endêmica em vários países da Bacia Mediterrânea, em países do Oriente Médio e no Brasil (DESJEUX, 2001). O cão é considerado o principal reservatório no ciclo doméstico do parasito (DEANE; DEANE, 1954; LAINSON; SHAW, 1987; MORENO-ALVAR *et al.*, 2002). Historicamente, as espécies de *Leishmania* que causam a enfermidade nas áreas geográficas no Velho Mundo e do Novo Mundo foram denominadas, respectivamente, de *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (NICOLLE, 1908; CUNHA; CHAGAS, 1937). Alguns autores, no entanto, acreditam que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são geneticamente indistinguíveis uma da outra e, por isso, as consideram como uma só espécie (MAURÍCIO *et al.* 1999; MAURÍCIO *et al.*, 2000; LUKES *et al.*, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos, na maioria das vezes, de um indivíduo para outro através da picada dos insetos vetores pertencentes ao gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, encontrados no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (LAINSON *et al.*, 1977).

A LV é considerada um grave problema para a saúde pública (BRASIL, 2003). Isso decorre do fato de que, a enfermidade é potencialmente fatal caso não seja instituído o tratamento adequado. Além disso, nas últimas décadas, tem ocorrido aumento no número de pessoas e da extensão de áreas geográficas afetadas por leishmaniose visceral (DESJEUX, 2001).

As medidas preconizadas para o controle dessa enfermidade são onerosas e laboriosas para serem mantidas de forma sistemática por um tempo prolongado, provavelmente necessário, para que sejam efetivas.

Nas áreas endêmicas de LV, a percentagem de cães que adquirem a infecção natural pode ser muito elevada, podendo mesmo atingir cerca de 80 % da população desses animais

(BERRAHAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALLEG0 *et al.* 2001; COURTENAY *et al.*, 2002). Além disso, uma parcela de cerca de 10 % dos cães desenvolve manifestações clínicas após a aquisição da infecção, que podem incluir linfadenopatia, lesões cutâneas, perda de peso, anormalidades nas unhas, esplenomegalia, uremia, lesões oculares, anorexia, epistaxe e diarréia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999). Quando cães enfermos são submetidos ao tratamento farmacológico, que provavelmente resulta na redução da carga parasitária, apesar de não promover a esterilidade da infecção, desenvolvem cura clínica. No entanto, a cura clínica é transitória, sendo que após a interrupção do tratamento, habitualmente, os cães apresentam recaída da doença (SLAPPENDEL & TESKE, 1997; MORENO *et al.* 1999; RHALEM *et al.*, 1999; BANETH & SHAW, 2002). Além disso, após algumas séries sucessivas de tratamento, que é geralmente realizado com os mesmos quimioterápicos usados na terapêutica humana, inóculos de *Leishmania* resistentes aos fármacos podem ser selecionados (GRAMICCIA, *et al.*, 1992). Pelas razões apontadas acima, leishmaniose visceral canina representa um grave problema em Medicina Veterinária.

Uma alternativa para o controle de LV do tipo zoonótico, no homem e no cão, poderia ser o uso de uma vacina contra LV canina (TESH, 1995; DYE, 1996). Idealmente, tal vacina deveria ser capaz de: a) impedir a aquisição da infecção pelos cães ou b) após a aquisição da infecção, prevenir ou reduzir substancialmente a transmissão do parasito de cães para o flebótomo e, c) prevenir o desenvolvimento de doença nesses. Infelizmente, até o momento, não há uma vacina que tenha sido suficientemente avaliada e apresente as propriedades indicadas acima.

As informações disponíveis na literatura sugerem que a resposta imune capaz de controlar a infecção por *Leishmania* no homem, no camundongo e no cão é uma resposta celular, na qual há produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e metabólitos do oxido nítrico ou oxigênio (PINELLI *et al.* 1994, GHALIB *et al.* 1995, RIBEIRO-DE-JESUS *et al.* 1998). Portanto, provavelmente, para que uma vacina seja capaz de induzir resistência contra a infecção, ela deve promover uma resposta imune eficiente e do tipo Th1 contra a *Leishmania*.

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, alguns antígenos recombinantes (Lc9, Lc12, Lc13, Lc14, Lc16, Lc18 e Lc30), naturalmente imunogênicos

para o cão, codificados por cinco diferentes genes, foram selecionados a partir de uma biblioteca de cDNA de *Leishmania chagasi* (TEIXEIRA *et al.*, 2007). A resposta imune induzida pelo antígeno Lc9 isoladamente ou em associação com adjuvantes compatíveis com o uso no cão foi avaliada em camundongos BALB/c. Os resultados desse experimento mostraram que Lc9, isoladamente, induz resposta imune do tipo Th2 e que apenas a saponina, um dos adjuvantes avaliados, promovia uma resposta imune mista (Th1/Th2) (FRAGA, 2007).

A IL-12 é uma citocina produzida principalmente por células apresentadoras de antígeno profissionais (células dendríticas, macrófagos, monócitos e linfócitos B) e neutrófilos (WATFORD *et al.*, 2003) que exibe várias atividades funcionais, incluindo a de promover a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> virgens para células do tipo T CD4<sup>+</sup> Th1 (HSIEH *et al.*, 1993).

Vários autores demonstraram que IL-12 pode favorecer o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1 quando co-administrada com antígenos (AFONSO *et al.*, 1994; YAMAKAMI *et al.*, 2001; TEWARY *et al.*, 2007).

No presente trabalho, camundongos BALB/c foram imunizados com a combinação Lc9 e saponina em associação com diferentes doses de um plasmídeo codificando IL-12 murina visando à definição de condições apropriadas para a indução de uma resposta imune específica predominantemente ou exclusivamente do tipo Th1. O conhecimento de condições apropriadas para a indução desse tipo de resposta imune através do uso de IL-12, provavelmente, seria útil no planejamento de experimentos de imunização de cães com o objetivo de se desenvolver uma vacina contra leishmaniose visceral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

#### 2.1.1 Considerações gerais sobre a leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania* (RIOUX *et al.*, 1990). As espécies que, mais frequentemente, causam a doença, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, formam o complexo donovani (LAINSON *et al.*, 1987; MURRAY *et al.*, 2005). Embora com menor frequência, outras espécies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* e *Leishmania tropica*) também podem causar a doença (MURRAY *et al.*, 2005).

A *Leishmania donovani* causa uma antroponose distribuída principalmente no subcontinente Indiano, na Ásia e na África enquanto que a *Leishmania infantum*, ou *Leishmania chagasi*, causa uma zoonose que afeta especialmente a Bacia Mediterrânea, a região central e o sudoeste da Ásia, além da América do Sul (DESJEUX, 2001). Cerca de 90 % dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil (WHO, 2002).

Protozoários das espécies do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e necessitam de um animal invertebrado e outro vertebrado para completarem seu ciclo de vida. Durante um repasto sanguíneo realizado pelo flebótomo em um hospedeiro vertebrado infectado, que na forma zoonótica da leishmaniose visceral pode ser o cão, o parasito pode ser adquirido pelo inseto. No tubo digestivo do inseto, o protozoário se transforma e passa a exibir a forma flagelada denominada promastigota. Tal forma se adere às vilosidades das células intestinais e passa por um processo de multiplicação e mudanças bioquímicas, resultando em formas infectivas chamadas promastigotas metacíclicas (RITTIG; BOGDAN, 2000). Quando o inseto vetor faz um novo repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas podem ser depositadas na derme do hospedeiro vertebrado, que pode ser o homem ou o cão. No hospedeiro vertebrado, o parasito pode penetrar em macrófagos, alojar-se dentro de organelas denominadas fagolisosomas, transformar-se em amastigota, que é uma forma sem flagelo evidente a microscopia óptica, e multiplicar-se. A partir daí, provavelmente no

interior de células, os parasitos podem disseminar-se para órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como por exemplo, baço, fígado, medula óssea e linfonodos (HANDMAN, 2001; BRASIL, 2003, MC ADAM; SHARPE, 2005).

A *Leishmania* é transmitida ao homem pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae* e sub-família *Phebotominae*, conhecidos comumente como flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie transmissora da *Leishmania chagasi* no Brasil (LAINSON *et al.*, 1977). Recentemente, no Estado de Mato Grosso do Sul, uma outra espécie, *Lutzomyia cruzi*, vem sendo apontada como responsável pela transmissão do parasito (BRASIL, 2003).

Existe uma concordância generalizada na literatura científica que o cão doméstico (*Canis familiaris*) representa o principal reservatório da *L. infantum* ou *L. chagasi*. Acredita-se que a *L. chagasi* é mantida em comunidades urbanas e peri-urbanas através de um ciclo cão-inseto-cão (WHO EXPERT COM, 1990, MORENO *et al.*, 2002). Em áreas endêmicas, a percentagem de cães naturalmente infectados pode ser muito elevada, podendo atingir a cifra de 80 % (BEHARRAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALEGO *et al.*, 2001 e QUINNEL *et al.*, 2001). Experimentos nos quais cães infectados são expostos a flebotomos, a transmissão do parasito para o inseto vetor do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* ocorre com grande frequência (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1994; MOLINA *et al.*, 1994; GUARGA *et al.*, 2000; TRAVI *et al.*, 2001; COURTENAY *et al.*, 2002; MICHALSKY *et al.*, 2007). Além do cão, em ambiente silvestre no Brasil, duas espécies de raposa a *Lycalopex ventulus* e *Cerdocyon thous* e uma de marsupial *Didelphis marsupialis* são consideradas como reservatórios do parasito (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996; BRASIL, 2003; CABRERA *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

#### - No homem

Após a inoculação do parasito pelo flebótomo na derme do homem, na dependência de vários parâmetros, como idade, estado nutricional, fatores genéticos, resposta imune inata e resposta imune adquirida, pode se estabelecer uma forma de infecção assintomática,



oligossintomática ou polissintomática, essa última referida como a forma clássica da LV (MURRAY *et al.*, 2005). Além disso, fatores genéticos do parasito devem contribuir para o tipo de desfecho que a infecção pode ocasionar no hospedeiro. Enquanto que a forma assintomática pode passar completamente despercebida e muitos casos da forma oligossintomática podem evoluir para cura espontânea (PAMPIGLIONE *et al.*, 1975, BADARÓ *et al.*, 1986), a forma clássica é habitualmente fatal, caso não seja aplicado o tratamento específico. Os indivíduos que desenvolvem a forma clássica da LV podem apresentar várias manifestações clínicas, incluindo febre prolongada, perda de peso, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia e sangramento espontâneo (EVANS *et al.*, 1985; PEARSON *et al.*, 2000).

O desenvolvimento das manifestações clínicas na LV está relacionado à incapacidade do hospedeiro em controlar a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear e pela instalação de um processo inflamatório crônico ineficaz em vários órgãos (ASHFORD, 2000).

Os achados laboratoriais que costumam ser encontrados em pacientes com a forma clássica da enfermidade são eritropenia, leucopenia e plaquetopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (HANDMAN, 2001; GUERIN *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2005; GARG; DUBE, 2006). A hipergamaglobulinemia provavelmente decorre de ativação policlonal de linfócitos B que produz grandes quantidades de anticorpos (GALVÃO-CASTRO, 1984).

- No cão

O cão, quando é naturalmente inoculado com o protozoário, tal como o homem, também pode exibir uma das três formas clínicas da doença: assintomática, oligossintomática e polissintomática (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; ABRANCHES *et al.*, 1991; MORENO *et al.*, 1999) Provavelmente, vários aspectos relacionados ao cão, incluindo idade, estado nutricional, fatores genéticos e imunológicos (MORENO; ALVAR, 2002, QUINNEL *et al.*, 2003) e fatores relacionados a cepa do parasito influenciam na evolução da infecção nesse animal. Os animais que desenvolvem a forma polissintomática, considerada como forma clássica da LV canina, apresentam,

principalmente, os sinais e sintomas descritos a seguir: lesões cutâneas (perda de pelo, descamação e ulceração); perda de peso; linfadenomegalia, lesões oculares, epistaxe, apatia, anemia, insuficiência renal, onicogribose e diarreia (CIARAMELLA *et al.*, 1997, KOUTINAS *et al.*, 1999; FERRER, 1999) Os achados clínico-patológicos mais freqüentemente observados no cão são: eritropenia, plaquetopenia, neutrofilia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e uremia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Aspectos gerais da imunidade contra protozoários do complexo *Leishmania donovani*

A resposta imune contra protozoários do complexo *Leishmania donovani* tem sido estudada em seres humanos e em cães. Devido às limitações éticas e a complexidade para se realizar experimentos no homem e no cão e para compreender-se a interação entre sistema imune do hospedeiro vertebrado e o parasito, vários pesquisadores procuraram identificar um modelo animal apropriado. Dentre os animais utilizados como modelo para a obtenção de informações sobre as interações mencionadas, o mais estudado é o camundongo (KAYE *et al.*, 2004).

A resposta contra patógenos que invadem organismos vertebrados, em especial os mamíferos, pode ser dividida em imune inata e resposta imune adquirida. A resposta imune inata, que conta com a participação células como neutrófilos, células “natural killers (NK)”, macrófagos, células dendríticas, deve participar no combate inicial assim que o protozoário é inoculado na derme. Essas células podem promover o controle da multiplicação do parasito ou produzir citocinas capazes de influenciar o tipo de resposta imune adquirida que, mais tarde, será desenvolvida contra o patógeno (STENGER; ROLLINGHOFF, 2001).

Durante a evolução o sistema imune de mamíferos desenvolveu duas estratégias diferentes para lidar com patógenos que invadem e residem dentro de células (patógenos intracelulares, por exemplo: algumas bactérias, protozoários e vírus) e patógenos que vivem extracelularmente, ou seus produtos, e que podem circular no interior do organismo (por exemplo: algumas bactérias, toxinas bacterianas e vírus). A resposta dirigida contra patógenos intracelulares é denominada resposta imune celular enquanto que a resposta imune contra elementos extracelulares é chamada de humoral.

Mosmann *et al.* (1986) ao avaliarem a produção de citocinas de clones de células T CD4 + (células T auxiliaadoras) estimulados por antígenos ou por concanavalina A (Con A) descobriram que essas células poderiam ser classificadas em dois tipos que denominaram Th1 e Th2. Os linfócitos do tipo Th1 produzem IFN- $\gamma$ , interleucina (IL)-2, IL-3, fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), e fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e são responsáveis pela imunidade celular, por reações inflamatórias, e também, pela produção de anticorpos da classe IgG2a. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e são responsáveis pela imunidade humoral e reações alérgicas (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Após inoculação do protozoário do complexo *Leishmania donovani*, provavelmente, na dependência da resposta imune inata e do tipo de resposta imune adquirida (CARVALHO *et al.*, 1992), o ser humano ou o cão pode desenvolver desde uma forma inaparente da infecção até uma enfermidade sistêmica grave.

Infelizmente, pouco se conhece sobre a atuação das células responsáveis pela resposta imune inata nos tecidos de seres humanos ou em cães após à infecção. Entretanto, estudos em camundongos mostram que em uma fase inicial da infecção a multiplicação parasitária no interior de células fagocíticas pode ser, em parte, controlada geneticamente contando com a participação de um gene (*Sc11A1*, antigo *Nramps1*) envolvido no controle da infecção parasitária (VIDAL *et al.*, 1995). Esse gene codifica uma proteína transportadora de íons, localizada na membrana de fagolisossoma de macrófagos. Polimorfismos presentes em *Sc11A1* já foram relacionados com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença no homem e no cão (ALTET *et al.*, 2002; MOHAMED *et al.*, 2004).

No camundongo, a resposta imune inata pode ter importante papel no controle da infecção por parasitos do complexo *L. donovani*, (KAYE *et al.*, 2004). Participam desse tipo de resposta células como neutrófilos, células *natural killer* (NK), macrófagos, células dendríticas (NATHAN *et al.*, 1983). A atividade leishmanicida é depende da capacidade dos macrófagos em produzir radicais de oxigênio e nitrogênio tóxicos em resposta ao IFN- $\gamma$  produzido principalmente por células células NK e, mais tarde, por células TCD4+ Th1, (BARRAL-NETTO *et al.*, 1998; GRADONI, 2001).

A resposta imune tipo Th1, ou a predominância dos efeitos das citocinas produzidas por células T auxiliaadoras Th1, é exibida por seres humanos e cães que desenvolvem a forma assintomática da leishmaniose visceral (PINELLI *et al.* 1994, RIBEIRO-de-JESUS *et al.* 1998). Se, após a infecção pela *Leishmania*, linfócitos TCD4+ do tipo Th1 são estimulados, ocorre a produção predominante de IFN- $\gamma$ , com conseqüente ativação do macrófago e destruição do parasito (MURRAY; NATHAN, 1999). Além disso, hipersensibilidade cutânea tardia e resposta linfoproliferativa, frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* foram observadas em seres humanos (DE ANDRADE *et al.*, 1982; CARVALHO *et al.*, 1992, D'OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 1997), assim como em cães infectados natural ou experimentalmente com *L. chagasi* (PINELLI *et al.*, 1994; RHALEM *et al.*, 1999).

Já os indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por células T CD4+ Th2 (CARVALHO *et al.*, 1985; GHALIB *et al.*, 1993; SUNDAR *et al.*, 1997). Neste tipo de resposta, ocorre uma predominância da produção endógena de IL-10 e IL-4 sobre o IFN- $\gamma$ , além de uma ativação policlonal das células B, o que leva a uma hipergamaglobulinemia (KHARAZMI *et al.*, 1999).

Linhagens de camundongos podem ser classificadas como susceptíveis (BALB/c e C57BL/6) ou resistentes (CBA, C3H/HeJ) à infecção por protozoário do complexo *L. donovani* (KAYE *et al.*, 2004). Embora as linhagens de camundongo susceptíveis não cheguem a apresentar uma forma grave da doença tal como pode ocorrer em casos humanos ou caninos, o estudo da resposta imune nesse animal pode contribuir na elucidação da participação de fatores e mecanismos imunológicos que participam e influenciam os desfechos clínicos conseqüentes à infecção.

Após a infecção experimental com *L. chagasi* em camundongos de linhagem susceptível, os animais desenvolvem parasitismo no fígado e no baço de forma diferente. Formas amastigotas do parasito se multiplicam rapidamente nas 4 primeiras semanas após a infecção, quando então caem substancialmente na oitava semana. Entretanto, a multiplicação dessas formas no baço ocorre mais tardiamente e se mantém por um longo período de tempo (WILSON; WEINSTOCK, 1996).

Estudos realizados em células imunes isoladas em granulomas presentes no fígado de camundongos, no estágio inicial da infecção por *L. chagasi*, têm demonstrado um defeito local na produção de IFN- $\gamma$  devido a fatores solúveis liberados no sobrenadante da cultura de esplenócitos. No entanto, existe uma ampla produção de IFN- $\gamma$  antígeno específico por esplenócitos dos mesmos animais (WILSON; WEINSTOCK, 1996). Fatores imunossupressores, como por exemplo TGF- $\beta$ , tem sido associado a essa inibição, uma vez que a utilização de anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$  revertem a inibição da produção de IFN- $\gamma$  (WILSON et al., 1998). No baço, a persistência do parasitismo está associada à desagregação de arquitetura e a falta de formação de granulomas, provavelmente, conseqüentes a produção exagerada de TNF, além da síntese de IL-10 e TGF- $\beta$  nesse órgão (WILSON et al., 1998; KAYE et al., 2004).

## 2.2 O uso da interleucina-12 como agente modulador da resposta imune contra a *Leishmania*

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina que foi inicialmente caracterizada por Kobayashi e colaboradores (1989) e, posteriormente, clonada a partir de células B transformadas com vírus Epstein-Barr (GUBLER et al., 1991). A IL-12 é uma proteína heterodimérica, com mobilidade relativa correspondente a 70-75 kDa (p70), composta pelas subunidades p35 e p40. Essas subunidades são codificadas por dois genes, distintos entre si, e localizados em cromossomos diferentes. O heterodímero p70 estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células “natural killer” (NK), promove diferenciação de linfócitos T CD4+ em células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , além de aumentar a atividade citolítica de células NK ativadas e de linfócitos T CD8+ (KOBAYASHI et al., 1989). A IL-12 é produzida, principalmente, por células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e por neutrófilos (TRINCHIERI, 2003).

A identificação de IL-12 como elemento chave no desenvolvimento de resposta imune celular do tipo Th1 levou ao uso desta citocina como agente imunomodulador da resposta imune e como adjuvante em formulações candidatas a vacina (HEINZEL et al., 1993; AFONSO et al., 1994; STOBIE et al., 2000; YAMAKAMI et al., 2001; LUCAS; HELLER, 2001; SALDARRIAGA et al., 2006; TEWARY, et al., 2006).

Camundongos BALB/c, que receberam IL-12 murina recombinante durante a primeira semana da infecção experimental com *L. major*, apresentaram uma resposta imune protetora, com controle da multiplicação do parasito, aumento da produção de IFN- $\gamma$  e redução da produção de IL-4 por esplenócitos estimulados *in vitro* por antígenos parasitários (HEINZEL et al., 1993).

De forma semelhante, a resposta imune gerada em camundongos BALB/c injetados com extrato de antígenos solúveis de *L. major* e a IL-12 na forma de proteína foi caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  e ausência de síntese de IL-4 em células do linfonodo drenante. Os níveis de IFN- $\gamma$  encontrados nas culturas de células desses animais foram até maiores do que os observados em animais pertencentes à linhagem C3H/HeN, resistente a *L. major*, injetados com extrato de antígenos solúveis de *Leishmania*. Por outro lado, os grupos de camundongos BALB/c controles negativos, que receberam apenas IL-12 ou somente extrato de antígenos, produziram pequenas quantidades das citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-4) e uma resposta do tipo Th2, respectivamente (AFONSO et al., 1994).

Yamakami et al. (2001) induziram uma resposta imune protetora em camundongos BALB/c contra leishmaniose ao administrarem, uma semana antes da inoculação dos animais com os parasitos vivos, extrato de antígenos solúveis de *L. major* e 10  $\mu$ g de plasmídeo codificando IL-12 murina (pCAGGS-IL-12). Os animais injetados com a combinação, extrato de antígenos e pCAGGS-IL-12, desenvolveram uma resposta tipo Th1, que foi demonstrada pela produção de IFN- $\gamma$  e produção predominante de IgG2a, quando comparados com animais que receberam plasmídeo vazio (pCAGGS) e extrato de antígenos ou apenas pCAGGS-IL-12.

Realizando experimentos em camundongos BALB/c, Tewary e colaboradores, (2006) observaram que a administração de um antígeno recombinante de *L. donovani* “recombinant open reading frame F” (rORFF) e um plasmídeo codificando IL-12 murina (VR-IL-12) promoveu uma resposta imune protetora contra leishmaniose visceral experimental mais intensa que a obtida com a imunização usando-se somente rORFF. A resposta imune observada pela administração de rORFF e VR-IL-12 foi caracterizada por um aumento da resposta linfoproliferativa além de produção de: IFN- $\gamma$ , anticorpos da subclasse IgG2a e baixos níveis de IL-4. Como a administração de apenas rORFF resultou

em uma resposta mista Th1/Th2, a associação de rORFF a VR-IL-12 resultou em um desvio na direção de uma resposta imune do tipo Th1 (TEWARY *et al.*, 2006)

Recentemente, nosso grupo demonstrou que células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* aumentam a expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  quando cultivadas na presença de IL-12 canina recombinante de cadeia única, mesmo na ausência de estímulo antigênico adicional (DOS SANTOS *et al.*, 2004). Além disso, Strauss-Ayali *et al.* (2005), observaram que a estimulação de CMSP de cães, naturalmente ou experimentalmente infectados por *Leishmania infantum* com IL-12 canina recombinante restaurou ou promoveu aumento da resposta proliferativa específica e da produção de IFN- $\gamma$ . Finalmente, Saldarriaga *et al.* (2006) demonstraram que a administração de um plasmídeo codificando IL-12 (VR1051-IL-12p40-linker-p35) em cães induziu aumento da expressão de IFN- $\gamma$  em CMSP no plasma.

Os dados mencionados acima sugerem que IL-12 pode promover a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e a diferenciação dessas células para CD4<sup>+</sup> do tipo Th1.

Em experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, a injeção de uma proteína recombinante de *Leishmania chagasi* (Lc9) ou a injeção de Lc9 e saponina, induziu, em camundongos BALB/c, uma resposta imune do tipo Th2 e mista (Th1/Th2), respectivamente (FRAGA, 2007). Visando avaliar a capacidade de IL-12 em promover desvio de uma resposta Th1/Th2 para uma resposta Th1, foi realizado o presente estudo, no qual diferentes quantidades de um plasmídeo codificando IL-12 murina (pcDNA3.1-scmu-IL-12) foram utilizadas, em associação com Lc9 e saponina, em um protocolo de imunização em camundongos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Definir condições apropriadas para indução de resposta imune do tipo Th1, a fim de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c injetados com um antígeno recombinante de *Leishmania chagasi* (Lc9), saponina e diferentes doses de um plasmídeo codificando IL-12 murina , no que diz respeito a:

- Produção de anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1;
- Resposta proliferativa de esplenócitos, após estimulação específica *in vitro*;
- Produção de citocinas (IFN-gama, IL-4 e IL-5) por esplenócitos, após estimulação específica *in vitro*.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Antígenos

#### 4.1.1 Obtenção de lisado de *Leishmania chagasi*

Para realização de ensaios imunológicos (de linfoproliferação e para produção de citocinas), antígenos de *Leishmania chagasi* da cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 foram utilizados sob forma de lisado de promastigotas.

Previamente, exemplares da cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2 foram isolados de tecido esplênico de um paciente com quadro clínico de leishmaniose visceral e residente em Jequié – Bahia. O material obtido do baço foi incubado com meio de cultivo e, após proliferação, a suspensão dos protozoários foi armazenada em nitrogênio líquido. Posteriormente, essa cepa de *Leishmania* foi caracterizada (Paranhos-Silva *et al.*, 2001). Desde então, a cepa vem sendo mantida no laboratório através de passagens sucessivas em meio de cultivo Schneiders (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) ou em hamsters.

Para a obtenção de promastigotas, no presente trabalho, um fragmento de baço de hamster infectado foi macerado e, em seguida, incubado em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich), pH 7.2, suplementado com 20 % de soro bovino fetal inativado (SBF, Gibco BRL Life Technologies, EUA). A suspensão de promastigotas resultante foi incubada a 24° C até o final da fase de crescimento logarítmico ou início da fase estacionária. Após passagens sucessivas, cada vez em volumes maiores de meio de cultivo, as promastigotas foram lavadas três vezes com cloreto de sódio a 0,9 %. Após a lavagem, os protozoários foram centrifugados a 3.500 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. Os protozoários do último sedimento foram ressuspensos em cloreto de sódio a 0,9 % e armazenados a -20 °C até o momento do uso. Posteriormente, os protozoários da suspensão foram submetidos à lise por sonicação (cinco pulsos de 40 Hz, com 45 segundos de duração em cada pulso e com 60 segundos de intervalo entre cada dois pulsos consecutivos, realizada sob o gelo), usando-se um aparelho Ultrasonic Processor (PGC Scientifics, Gaithersburg, Maryland, EUA). A concentração protéica do lisado foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e alíquotas foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Para a obtenção de material estéril para uso em ensaios celulares, alíquotas do lisado de *Leishmania* foram submetidas à irradiação gama, 60.000 rads sob o gelo, usando-se irradiador IBL 437C (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette Cedex, França), antes de serem armazenadas a -20 °C.

#### 4.1.2 Obtenção do antígeno recombinante de *Leishmania chagasi* (Lc9)

Previamente, em nosso laboratório, visando à seleção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* a serem avaliados como candidatos a componentes de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, uma biblioteca de cDNA da forma amastigota de *L. chagasi* (cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2) foi construída em fago lambda (ZAP Express, Stratagene, La Jolla, CA, EUA). A partir de uma triagem inicial da biblioteca, 30 clones de fagos recombinantes contendo segmento de cDNA de *L. chagasi* foram selecionados pela reatividade das proteínas recombinantes produzidas com anticorpos de uma mistura de soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, apresentando resposta imune humoral e celular específica (TEIXEIRA *et al*, 2007).

Os fagos selecionados foram submetidos à excisão para a obtenção dos plasmídeos recombinantes correspondentes (pBK-CMV contendo insertos de cDNA de *L. chagasi*), conforme recomendações do fabricante (Stratagene). Com o seqüenciamento do DNA das extremidades 5'e 3' e a comparação com seqüências dos bancos de dados GeneDb ([www.genedb.org](http://www.genedb.org) – “The Wellcome Trust Institute, Pathogen Sequencing Unit”) e do GenBank no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) – “National Center for Biotechnology Information”) cada inserto foi caracterizado. O inserto de um dos clones, denominado Lc9, foi subclonado em um plasmídeo pRSETB (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), gerando a construção pRSETB-Lc9. Essa construção codifica uma proteína recombinante de fusão, Lc9, com uma seqüência de seis histidinas na extremidade N-terminal.

*Escherichia coli* da cepa BL21(DE3)pLysS foi transformada com o plasmídeo pRSETB-Lc9 e a produção da proteína recombinante foi induzida seguindo-se instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Resumidamente, uma colônia de *E. coli* transformada com o pRSETB-Lc9 foi usada para a preparação de um pré-inóculo e, posteriormente, em um volume maior de cultura contendo os antibióticos apropriados

[caldo Luria-Bertani (LB): bacto-triptona a 1 % (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5 % (m/v, Isofar, Duque de Caxias – RJ), cloreto de sódio a 1 % (m/v, Isofar), pH 7.0, 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich)]. A suspensão de bactérias foi incubada a 250 rpm, a 37°C, até que densidade óptica a 600 nm atingisse de 0,4 a 0,6. A partir daí, para a indução da produção da proteína recombinante, Isopropil-β-D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) foi adicionado à suspensão para alcançar uma concentração final de 0,1 mM. Após 3 horas de incubação, nas mesmas condições, a suspensão de bactéria foi centrifugada a 6.000 g, 4 °C, por 15 minutos e o sedimento foi armazenado a -20 °C até o momento do uso. Uma alíquota da cultura de bactéria foi coletada para avaliação da produção da proteína Lc9 em gel de poliacrilamida com duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970).

#### 4.1.2.3. Purificação da proteína recombinante Lc9 por cromatografia de afinidade

O sedimento bacteriano obtido foi ressuspenso em tampão de lise a 4° C (20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 10mM Imidazol, pH 8.0), 3 mL de tampão/1 g de sedimento, com auxílio de um agitador vórtex (Labnet, Woodbridge, NJ). Em seguida, lisozima (Sigma-Aldrich) foi adicionada para atingir uma concentração final de 1 mg/mL. A suspensão foi incubada a 4° C por 30 minutos. Depois disso, 4 mg de desoxicolato de sódio (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) /1g de sedimento foram acrescentados e a suspensão foi incubada a 37 °C, por aproximadamente 1 hora. Com o objetivo de fragmentar o DNA genômico da bactéria, a suspensão foi submetida a sonicação (quatro pulsos de 300 Watts, com 30 segundos de duração de cada por pulso e com intervalos de 10 segundos entre cada dois pulsos consecutivos), sob o gelo. Em seguida, foi realizada centrifugação a 17.000 g, a temperatura ambiente, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido ao fracionamento cromatográfico, utilizando-se a resina “Sepharose Chelating Sepharose Fast Flow” e seguindo-se as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences Corp., New Jersey, EUA). Resumidamente, resina lavada com água destilada foi incubada com NiSO<sub>4</sub> (Merck, São Paulo, Brasil) a 100 mM, sob agitação, a temperatura ambiente, por 15 minutos. A resina foi novamente lavada com água destilada, equilibrada

com tampão de lise e incubada com o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas durante 30 minutos, sob agitação, a temperatura ambiente. Lavagem com o tampão contendo 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 31,25 mM Imidazol, pH 8.0 foi realizada para retirada do material não ligado à resina. As proteínas ligadas à resina foram eluídas pela adição do tampão: 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl e 500 mM Imidazol, pH 8.0. O eluato obtido, contendo as proteínas de interesse, foi submetido à diálise contra tampão PBS (150 mM, pH 7.2), a 4° C, realizando-se três banhos, cada um de 8 horas. Após a diálise, a concentração protéica foi determinada pelo método da Lowry (LOWRY, 1951) e o grau de pureza foi determinado por SDS-PAGE e coloração com azul de Commassie.

Para a obtenção de material estéril para uso em ensaios celulares, a proteína recombinante Lc9 purificada foi submetida à irradiação gama, 60.000 rads sob o gelo, usando-se irradiador IBL 437C (CIS Bio International).

A concentração da proteína Lc9 obtida foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951).

#### 4.2. Obtenção do plasmídeo codificando IL-12 murina de cadeia única

Os plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 e pcDNA3.1 sem inserto (Invitrogen) foram produzidos em *E. coli*. A construção plasmideal pcDNA3.1-scmuIL-12, que codifica IL-12 como uma proteína de fusão de cadeia única, foi confeccionada, em nosso laboratório, pela subclonagem do inserto do plasmídeo pCI-neo-IL-12, gentilmente cedido pela Dra. Emanuela Handman (Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália, Noormohammadi *et al.*, 2001).

Para a produção dos plasmídeos, *E. coli* da cepa TOP10 (Invitrogen Corporation) transformadas com as construções pcDNA3.1-scmuIL-12 ou pcDNA3.1 sem inserto foram cultivadas por 16 horas em caldo de cultura LB com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). Após centrifugação, o sedimento bacteriano contendo DNA plasmideal foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

A purificação dos plasmídeos foi realizada através do método de lise alcalina e cromatografia de troca iônica usando-se um conjunto de reagentes da Qiagen (Plasmid Mega Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante.

No final do processo de purificação, os plasmídeos foram solubilizados em salina estéril, livre de endotoxinas, e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Antes do armazenamento, para determinação da concentração de DNA e grau de pureza, uma alíquota de cada um dos plasmídeos foi coletada. Posteriormente, as alíquotas foram avaliadas pela leitura da densidade óptica a 260 e 280 nm e pelo fracionamento em gel de agarose a 1 %.

### 4.3 Animais

Para avaliação da capacidade de pcDNA3.1-scmu-IL-12 em promover desvio da resposta imune em animais injetados com Lc9 e saponina, 48 camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas e machos, com idade entre 9 e 12 semanas, foram usados. Grupos de camundongos foram formados com seis animais cada um, sendo três fêmeas e três machos para cada grupo. Três animais do mesmo sexo foram alojados em cada caixa.

Para avaliação de efeitos tóxicos resultantes da administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação, 10 camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre 9-12 semanas. Grupos de cinco animais foram formados.

Os camundongos foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Esses animais foram alojados em caixas microisoladoras sob condições apropriadas de temperatura e umidade e receberam água e comida *ad libitum*.

O uso de animais na experimentação proposta nesse trabalho tem aprovação pelo comitê de ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

### 4.4 Injeção de camundongos com Lc9-saponina e pcDNA3.1-scmu-IL-12

Os 48 animais foram injetados, por via subcutânea na região dos flancos, nos dias 0, 21 e 42 do experimento. Nos dias mencionados, foram administrados em cada flanko de cada animal 100  $\mu\text{L}$  de salina (grupo controle negativo, G1), 100  $\mu\text{L}$  de saponina (Sigma-Aldrich) em salina a 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (grupo controle negativo, G2) ou 100  $\mu\text{L}$  de saponina em salina a 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e Lc9 a 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8). Imediatamente antes das injeções no dia 0, os animais foram injetados no músculo

gastrocnêmio com 50 µL pcDNA3.1 a 1.000 µg/mL (G4) ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 nas seguintes concentrações 1.000 µg/mL (G5), 200 µg/mL (G6), 40 µg/mL (G7) e 8 µg/mL (G8). Logo após a injeção, cada animal foi submetido a eletroporação (cinco pulsos de corrente elétrica contínua de 100 volts/cm, com duração de 20 milissegundos por pulso e intervalo de um segundo entre cada dois pulsos consecutivos) em torno da região muscular injetada, usando-se um eletroporador construído pelo Dr. Yuri Pepe, Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia. Para realização da eletroporação, cada animal foi anestesiado pela injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina a 100 mg/kg (AgribRANDS do Brasil Ltda, Paulínia, SP) e xilazina a 15 mg/kg (Bayer S. A., São Paulo, SP).

#### 4.5 Avaliação da resposta imune humoral

Para a avaliação da produção de anticorpos, amostras de sangue foram coletadas, pelo plexo orbital, após anestesia local com cloridrato de proximetacaína a 0,5 % (Anestalcon, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, SP), 10 dias após a última série de injeções. Após a coagulação das amostras de sangue, alíquotas de soro foram obtidas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

##### 4.5.1 ELISA para mensuração de anticorpos da classe IgG reativos com Lc9

Placas de microtitulação de 96 poços (Cliniplate, Thermo LabSystems, Finlândia), foram sensibilizadas com 100 µL/poço com Lc9 a 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  a 15 mM e  $\text{NaHCO}_3$  a 28 mM, pH 9.6), por 16 horas, a 4°C, em câmara úmida. Após duas lavagens com PBS, os poços receberam 200 µL/poço de PBS-T (v/v, PBS-T, Sigma-Aldrich) contendo 10 % de leite desnatado (m/v, PBS-LT, Itambé). As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Amostras de soro diluídas em PBS-LT (1:400, 1:2.000, 1:10.000, 1:50.000, 1:250.000 e 1:1.250.000), 100µL/poço, foram colocadas nos poços. Amostras de soros de camundongos obtidas em um experimento prévio foram usadas como controle positivo e negativo em cada ensaio. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, os poços foram

lavados 3 vezes com PBS-T. Anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos a 1:400 em PBS-LT, foram adicionados, 100  $\mu$ L/poço, aos poços. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e, depois, os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBS-T. A cada poço foram acrescentados 150  $\mu$ L de substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) e as placas foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente. O substrato foi preparado pela mistura de 150  $\mu$ L de TMB (10 mg/mL), 2,91 mL de acetato de sódio 0,05 M (Sigma-Aldrich), 90  $\mu$ L de ácido cítrico 0,5 M (Sigma-Aldrich), 12 mL de água destilada e 15  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 30 % (Isofar). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 4 M (Quimex). A leitura da densidade óptica foi realizada a 450 nm em um espectrofotômetro (Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

#### 4.5.2. ELISA para mensuração de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG1 reativos com Lc9

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas conforme descrito previamente e, em seguida, os poços foram lavados com PBS-T. Os poços receberam 200  $\mu$ L/poço de PBS-T com 10% de soro bovino fetal (PBS-TS, CULTILAB), para bloqueio de sítios de ligação de proteína. As placas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem dos poços, as amostras de soro diluídas em PBS-TS, a 1:350.000, foram aplicadas em duplicata, 100  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e, depois, os poços foram lavados 4 vezes com PBS-T. Anticorpos de rato anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugados a biotina (Sigma-Aldrich), diluídos a 1:500 em PBS-TS, foram adicionados, 100  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente. Os poços foram então lavados 6 vezes com PBS-T e avidina conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluída 1:400 em PBS-TS, foi acrescentada, 150  $\mu$ L/poço. As placas foram incubadas por 45 minutos, à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 8 vezes com PBS-T e, em seguida, a cada poço foram acrescentados 100  $\mu$ L de substrato de peroxidase. O substrato foi preparado pela mistura de 1 mL de TMB a 1 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO);

Sigma-Aldrich), 9 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5.0 [Fosfato de sódio dibásico 0,2 M (Isofar), ácido cítrico 0,1 M (Sigma-Aldrich)] e 2 µL de peróxido de hidrogênio 30% P.A (Isofar). As placas foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido fosfórico (Quimex), diluído a 1:20. A leitura da densidade óptica foi realizada conforme descrição acima.

#### 4.6 Avaliação da resposta imune celular

Os ensaios para avaliação de proliferação celular e produção de citocinas, realizados com esplenócitos, foram feitos 4 semanas após a última série de injeções. Para isso, dois animais de cada grupo foram sacrificados a cada dia, durante 3 dias consecutivos.

##### 4.6.1 Ensaio de linfoproliferação

Após o sacrifício dos camundongos, o baço de cada animal foi removido assepticamente e colocado em placa de petri de 35 mm. Com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 3 mL, o baço de cada animal foi, separadamente, macerado em meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640; Sigma-Aldrich). Em seguida, as células esplênicas foram suspensas em 10 mL de meio RPMI em um tubo falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 700 rpm, por 5 segundos, para remoção de debris de tecido esplênico e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Os tubos foram centrifugado a 1.600 RPM, por 10 minutos, a 4 °C. O sedimento de cada tubo foi ressuspenso com 2 mL meio RPMI suplementado com 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen Corporation), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Nova Farma Ltda., Anápolis, GO, Brasil), aqui denominado meio RPMI completo. A concentração celular foi determinada, através de contagem em câmara de Neubauer, fazendo-se uma diluição 1:1 com o corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich), e ajustada para  $3 \times 10^6$  células/mL. Em placas de microtitulação de 96 poços, de fundo chato (Corning Incorporated), a suspensão de células de cada animal foi distribuída a 100 µL/ poço, em



triplicatas. Em cada triplicata de poços foram acrescentados 100µL/poço de meio RMPI completo, concanavalina A (Con A; Sigma-Aldrich) a 0,8 µg/mL, lisado de *L. chagasi* a 10 µg/mL (concentração protéica) ou Lc9 a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ou 10 µg/mL. As placas contendo células em meio de cultura ou meio de cultura com Con A foram incubadas por 3 dias. As placas contendo células em meio de cultura ou em meio de cultura e lisado de Leishmania ou Lc9 foram incubadas por 5 dias. A incubação das placas foi realizada a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada poço, foram adicionados 30 µL de meio RMPI completo contendo 1 µCi de timidina[H]<sup>3+</sup> (atividade específica 2 Ci/mmol - Amersham Biosciences). Após a adição da timidina, as placas foram incubadas por 18 horas e, em seguida, as placas foram congeladas até o momento da contagem de partículas betas, realizada durante um minuto (cpm) em um aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard).

#### 4.6.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN-γ, IL-4 e IL-5) por esplenócitos através do método ELISA

Placas de microtitulação de 24 poços, de fundo chato (Costar Corning Inc.), receberam 300 µL com 9 x 10<sup>5</sup> esplenócitos por poço, em duplicata, obtidos conforme descrito anteriormente. Um volume de 300 µL de meio RPMI completo, Con A a 0,8 µg/mL, lisado de *L. chagasi* a 10µg/mL ou Lc9 a 1 e 10µg/mL, foram acrescentados a cada poço da duplicata de poços. As placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, o sobrenadante de cada duplicata de poços foi coletado em tubos Eppendorf e centrifugado em microcentrífuga (Eppendorf), a 2.500 RPM, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e congelados a -20 °C até o momento do uso.

Para a mensuração de IFN-γ em células incubadas com Lc9, amostra de sobrenadante correspondente a cada animal foi avaliada separadamente. Para a mensuração de IL-4 e IL-5, misturas de sobrenadantes de cultivo celular dos animais de cada grupo foram preparadas com quantidade igual de sobrenadante de cada animal do grupo.

A determinação da concentração das citocinas foi realizada por ELISA de captura, usando-se anticorpos produzidos pela BD Pharmigen, seguindo-se recomendações do fabricante (BD Pharmigen). Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços (“High Binding”; Corning Incorporated Life Sciences) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de rato (2 µg/mL) anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4 ou anti-IL-5 murino, 50 µL/poço, durante 16 h, em câmara úmida, a 4°C. Os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e em seguida, receberam 200 µL/poço de PBS contendo 10% de soro bovino fetal (CULTILAB). As placas foram incubadas por 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Para a elaboração de uma curva de calibração, diluições seriadas de IFN- $\gamma$  murino [sobrenadante de células COS-7, linhagem fibroblástica de rim de macaco verde (CRL-1651, American Type Culture Collection – ATCC; Manassas, VA, EUA) transfectadas com pRSV2 - IFN- $\gamma$  murino], IL-4 (sobrenadante de células de linfoblastoma murino XR63-IL-4, Fritz Melchers, 1986), gentilmente cedido pelo Dr. José Mengele, e IL-5 recombinante (BD Pharmigen)] foram usadas em duplicatas de poços, 100 µL/poço. As amostras de sobrenadante de cultura foram testadas, diluídas 1:2, em duplicatas, 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 4 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Os poços foram lavados 4 vezes com PBS-T. Anticorpos de rato conjugados com biotina específicos para cada uma das citocinas foram usados na concentração de 2 µg/mL, com exceção do anticorpo anti-IL-4 que foi usado a 2,5 µg/mL, em volume de 100 µL/poço. As placas foram incubadas por 45 minutos, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Os poços foram lavados 6 vezes com PBS-T e a cada poço foi acrescentada avidina conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluída 1:400, 100 µL/poço. As placas foram incubadas por mais 30 min. Os poços foram lavados 8 vezes com PBS-T e a reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço do substrato de peroxidase (preparado pela mistura de 1 mL de TMB a 1 mg/mL em DMSO, 9 mL de tampão citrato-fosfato e 2 µL de peróxido de hidrogênio 30%). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido fosfórico, diluído 1:20. A leitura da densidade óptica a 450 nm, conforme descrito anteriormente.

#### 4.7 Avaliação de possíveis efeitos tóxicos resultantes da administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação

Como uso de eletroporação pode promover um grande aumento na produção de proteínas codificadas por plasmídeo (MIR *et al.*, 1999; LUCAS; HELLER 2001), para determinar se a maior quantidade de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (50 µg/animal) usada no presente trabalho seria segura, cada animal, de um grupo de cinco, foi injetado com 50 µL pcDNA3.1 a 1.000 µg/mL ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 a 1.000 µg/mL. Os animais foram injetados pela via intramuscular e submetidos a eletroporação conforme descrito previamente. Dez dias após a injeção, os camundongos foram sacrificados e o fígado, o baço, um linfonodo inguinal e um linfonodo poplíteo, assim como a carcaça de cada animal foram pesados utilizando-se uma balança Chaus Explorer Analytical Series (Ohaus Corporation, EUA).

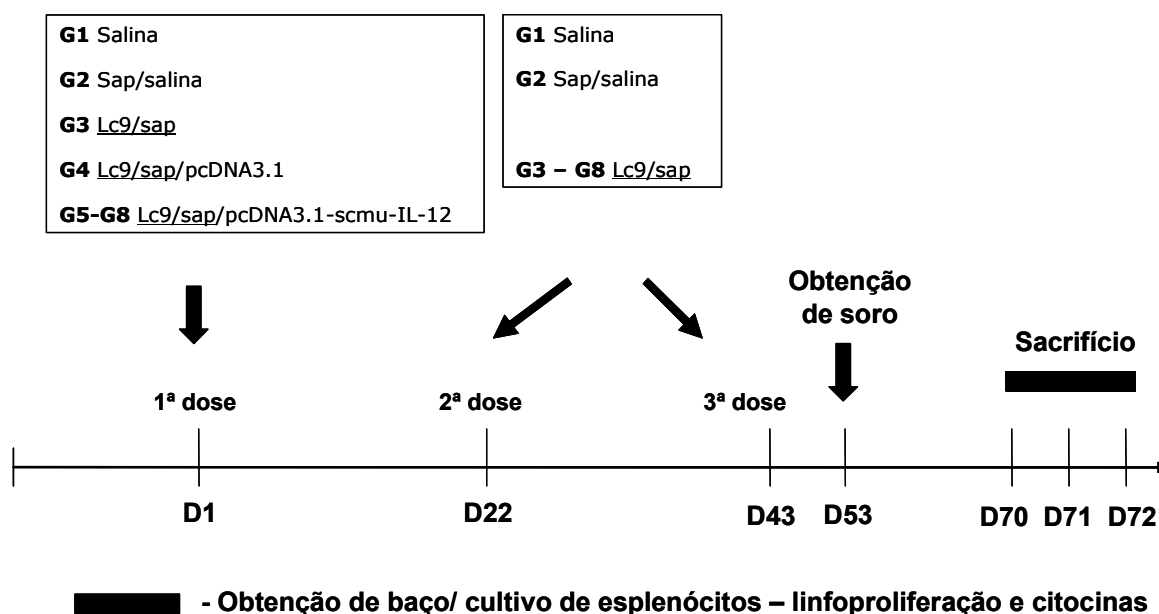


Figura 1: Desenho experimental

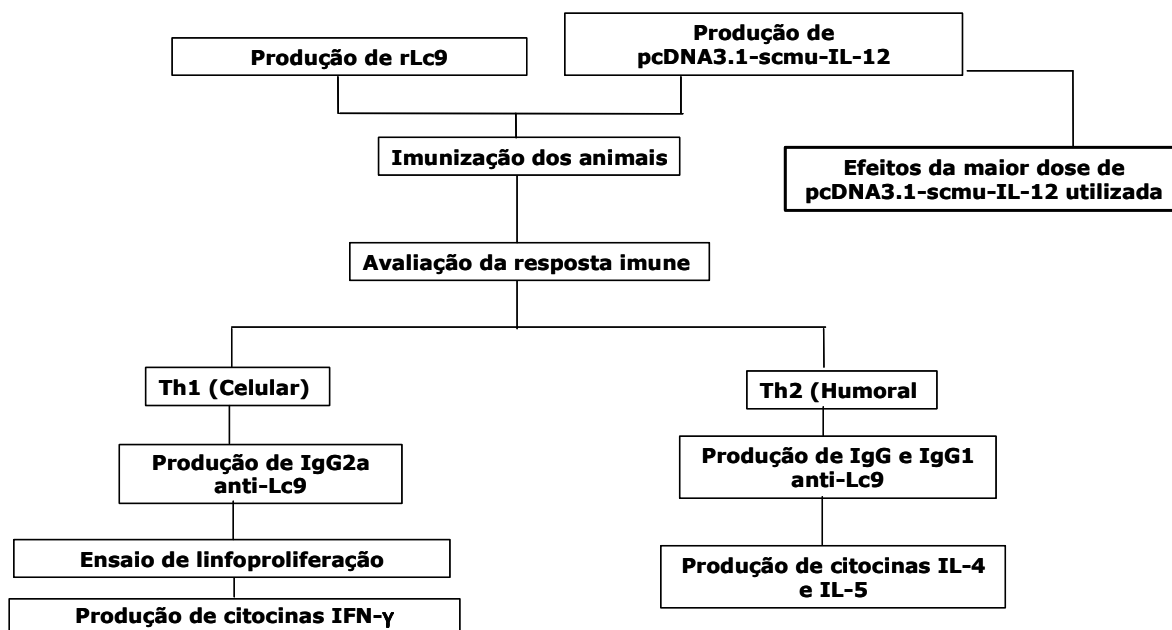


Figura 2: Organograma metodologia

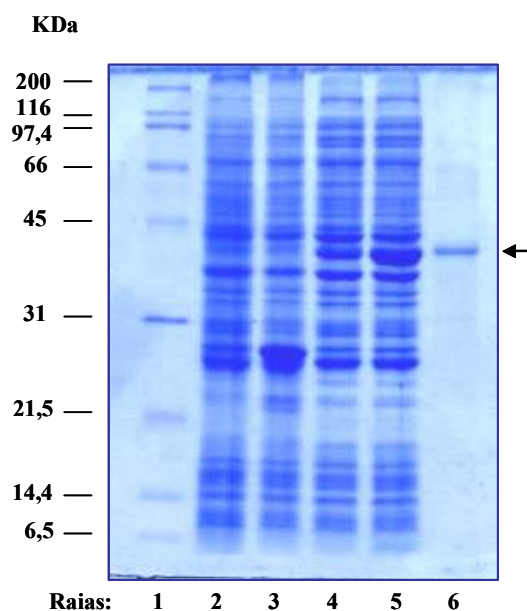
#### 4.8 Análise Estatística

A comparação da resposta imune humoral entre os grupos de animais foi realizada através do teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. A proliferação celular e produção de IFN- $\gamma$  pelos grupos de animais foram comparadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para comparação entre o peso dos órgãos dos animais para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos resultantes da administração de IL-12, Teste t não pareado foi utilizado. O valor fixado para significância estatística para todos os testes foi de  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da proteína recombinante de *L. chagasi* (Lc9) purificada

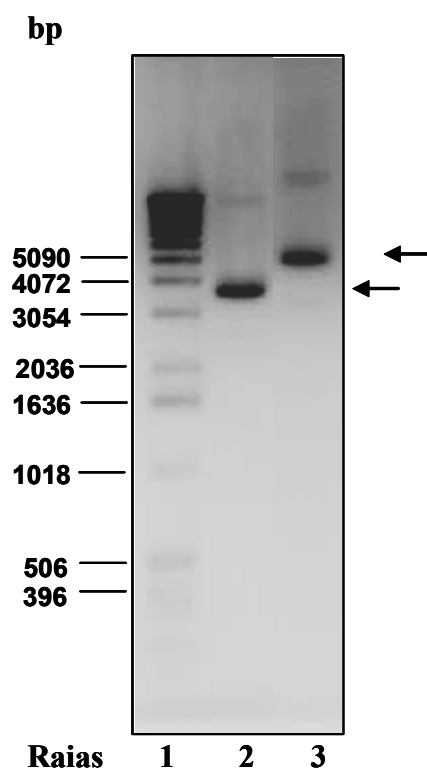
A proteína recombinante Lc9 foi produzida na forma solúvel em *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com plasmídeo contendo inserto codificando Lc9 (construção pRSETB-Lc9). Lc9 foi purificada por cromatografia de afinidade com coluna de Sepharose quelada com níquel. As frações de eluição da coluna contendo Lc9 foram submetidas à diálise contra PBS. Em seguida, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e o grau de pureza de Lc9 por eletroforese em gel de poliacrilamida corado por azul de Commassie. A concentração de proteínas obtida foi de 1,42 mg/ml, sendo o rendimento total de 42 mg (Figura 3).



**Figura 3.** Avaliação da proteína recombinante Lc9 produzida em *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com pRSETB-Lc9 e purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se coluna de Sepharose quelada com níquel, através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com duodecilsulfato de sódio. Raias: (1) marcadores de peso molecular, (2 e 3) lisado de BL21(DE3)pLysS-pRSETB após 0 e 3 h da indução com IPTG, (4 e 5) lisado de BL21(DE3)pLysS-pRSETB-Lc9 após 0 e 3 h da indução com IPTG, respectivamente, (6) proteína recombinante Lc9 purificada. A seta indica a proteína Lc9 purificada.

## 5.2. Avaliação de plasmídeos pcDNA3.1 e pcDNA3.1-scmuIL-12 purificados

Os plasmídeos pcDNA3.1 e pcDNA3.1-scmuIL-12 foram produzidos em *E. coli* da cepa TOP10 e purificados por cromatografia de troca iônica, usando-se reagentes e materiais da Qiagen. A quantificação das preparações dos plasmídeos, realizada pela leitura da densidade óptica, revelou que, a partir de 500 mL de cultura de *E. coli*, foram obtidos 4,6 mg de pcDNA3.1 e 2,1 mg de pcDNA3.1-scmuIL-12, respectivamente. As duas preparações apresentaram um bom grau de pureza dos plasmídeos, sendo a razão entre os valores de leitura óptica medidos a 260 e a 280 nm superior a 1,9. A avaliação da integridade dos plasmídeos em gel de agarose revelou a presença de bandas compatíveis com os plasmídeos purificados (Figura 4).



**Figura 4:** Análise da integridade dos plasmídeos produzidos em *E. coli* TOP10 transformadas com pcDNA3.1 ou pcDNA3.1-scmuIL-12, purificados por cromatografia de troca iônica com reagentes e materiais da Qiagen, através de gel de agarose a 1 % em tampão TAE. Raias: (1) marcadores de peso molecular, (2) pcDNA3.1 ou (3) pcDNA3.1-scmu-IL-12. As setas indicam bandas correspondentes aos plasmídeos, na forma super-espiralada, purificados.

### 5.3. Avaliação da resposta imune

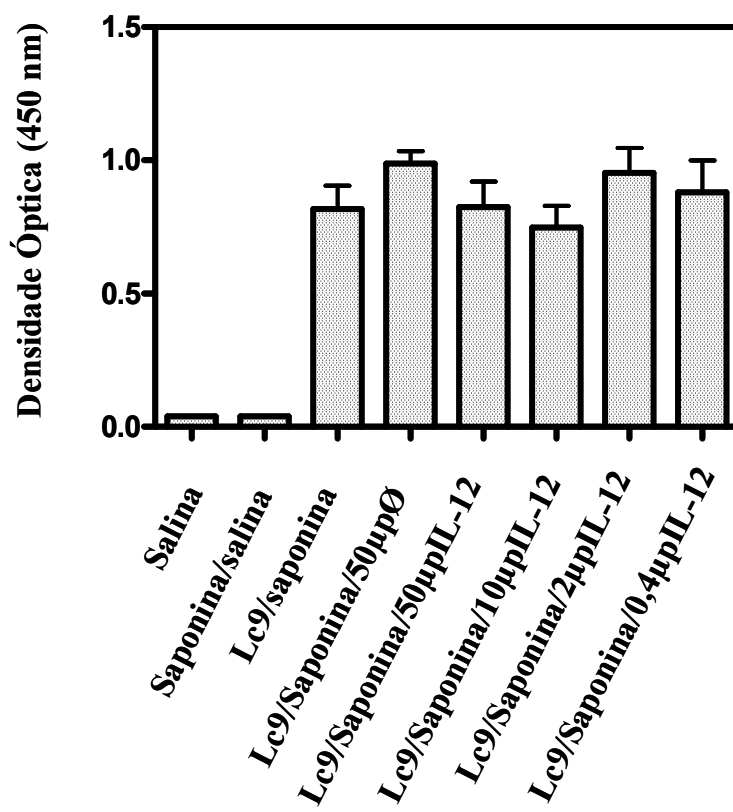
A resposta imune humoral e celular foram avaliadas 10 dias e quatro semanas após a terceira série de injeções, respectivamente.

#### 5.3.1 Avaliação da resposta imune humoral específica

A resposta imune humoral específica foi avaliada por ELISA.

##### 5.3.1.1 Avaliação da produção de anticorpos IgG e subclasses IgG2a e IgG1 reativos a Lc9

Os animais dos grupos injetados com L9 e saponina (G3) ou em associação com pcDNA3.1 vazio (G4) ou pcDNA3.1-scmuIL-12 (G5, G6, G7 e G8) produziram anticorpos específicos da classe IgG, comparados aos camundongos dos grupos injetados com salina ou saponina em salina. Dados de densidade óptica (média e desvio padrão,  $X \pm SD$ ) obtidos nos ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), realizados em placas de microtitulação sensibilizadas com Lc9 e amostras de soro diluídas de 1:100.000, são mostrados na Figura 3. A comparação dos valores de densidade óptica entre os grupos de camundongos, realizada por ANOVA, mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Comparações adicionais entre cada dois grupos de camundongos, realizadas através do pós-teste de Tukey, revelaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre cada um dos grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 e os grupos controles G1 e G2. As médias da densidade óptica dos grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8 não foram estatisticamente diferentes.



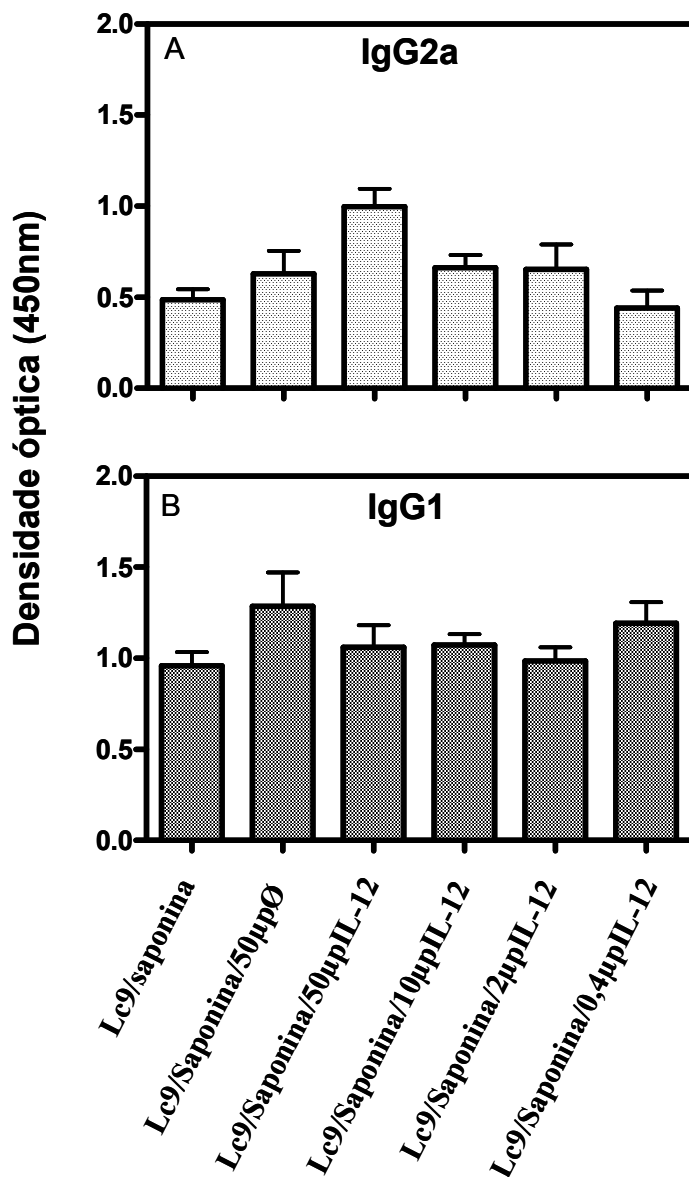
**Figura 5.** Avaliação da produção de anticorpos da classe IgG reativos a proteína recombinante Lc9 por ELISA, realizada conforme descrito em Material e Métodos. Grupos foram formados com seis camundongos BALB/c. Grupos de animais foram injetados três vezes com salina (G1), saponina em salina (G2), Lc9 e saponina (G3, G4, G5, G6, G7 e G8), por via subcutânea. Durante a primeira série de injeções, os animais receberam pcDNA3.1 vazio [50 µg por animal(G4)] ou pcDNA3.1-scµIL-12 [50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) e 0,4 µg (G8) por animal], por via intramuscular seguida de eletroporação. As barras representam os valores das médias aritméticas e desvios padrões dos grupos de animais, obtidos quando as amostras de soros foram avaliadas na diluição de 1:100.000. A comparação entre os grupos realizada por ANOVA revelou  $p < 0,0001$ . Pós-teste de Tukey mostrou diferença entre os grupos controles G1 e G2 em relação aos grupos que receberam G3, G4, G5, G6, G7 e G8.



Para a avaliação da produção dos anticorpos das subclasses IgG2a e IgG1 reativos a proteína recombinante Lc9, ELISAs foram realizados com amostras de soro diluídas de 1:50 (grupos G1 e G2) ou 1:350.000 (grupos G3 a G8).

Os grupos controles G1 e G2 não produziram anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a. Já os grupos de camundongos que receberam Lc9 e saponina (G3) ou Lc9, saponina e 50  $\mu$ g de pcDNA3.1 (G4) apresentaram valores de densidade óptica ( $X \pm SD$ ), correspondentes a IgG2a e IgG1 em amostras de soro avaliadas na diluição de 1:350.000, de  $0,49 \pm 0,14$  e  $0,96 \pm 0,18$ ;  $0,63 \pm 0,28$  e  $1,20 \pm 0,26$ , respectivamente (Figuras 6 A e 6 B). Os valores encontrados para os grupos de animais que receberam Lc9 e saponina e diferentes doses de pcDNA3.1-scmu-IL-12, 50  $\mu$ g (G5), 10  $\mu$ g (G6), 2  $\mu$ g (G7) ou 0,4  $\mu$ g (G8), de foram de:  $1,00 \pm 0,22$  e  $1,23 \pm 0,42$ ;  $0,66 \pm 0,18$  e  $1,06 \pm 0,30$ ;  $0,65 \pm 0,33$  e  $1,07 \pm 0,15$ ;  $0,44 \pm 0,24$  e  $1,00 \pm 0,19$ , respectivamente (Figuras 6 A e 6 B). Mesmo quando as amostras de soro foram avaliadas na diluição de 1:50, os resultados de densidade óptica dos animais dos grupos G1 e G2 não diferiram dos valores obtidos em poços nos quais diluente foi acrescentado ao invés de soro.

A comparação entre os grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8, realizada por ANOVA, revelou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.0127$ ) somente para a produção de IgG2a. Comparações adicionais dos valores referentes a IgG2a entre cada dois grupos, realizada pelo pós-teste Tukey, revelaram diferença entre os grupos G3 e G5 ( $p < 0,05$ ) e G5 e G8 ( $p < 0,01$ ). Contudo, a proporção dos valores de densidade óptica IgG2a/IgG1 dos grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8, cujas médias foram de: 0,51; 0,52; 0,81; 0,62; 0,60; 0,44, respectivamente, não apresentou diferença estatisticamente significativa (ANOVA).



**Figura 6.** Avaliação da produção de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG1 reativos a proteína recombinante Lc9, realizada conforme descrito em Material e Métodos. Grupos foram formados com seis camundongos BALB/c foram injetados com Lc9 e saponina (G3, G4, G5, G6, G7 e G8), por via subcutânea. Durante a primeira série de injeções, os animais receberam pcDNA3.1 vazio [50 µg por animal(G4)] ou pcDNA3.1-scµIL-12 [50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) e 0,4 µg (G8) por animal], por via intramuscular seguida de eletroporação. As barras representam os valores das médias aritméticas e desvios padrões dos grupos de animais, obtidos quando as amostras de soros foram avaliadas na diluição de 1:350.000. A comparação entre os grupos que receberam Lc9, realizada por ANOVA, revelou diferença estatisticamente significativa para a produção de IgG2a ( $p = 0.0127$ ). Pós-teste Tukey, revelou diferença entre os grupos quanto a produção de IgG2a;  $G3 < G5$  ( $p < 0,05$ ) e  $G5 > G8$  ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.2. Avaliação da resposta imune celular

A resposta imune celular foi avaliada em ensaio de proliferação de células esplênicas e pela mensuração da produção de citocinas (IFN- $\gamma$  IL-4 e IL5) no sobrenadante do cultivo celular, após estimulação com antígenos (lisado de *Leishmania* ou Lc9) ou mitógeno (Con A) *in vitro*.

#### 5.3.2.1 Ensaio de linfoproliferação

Os valores de cpm ( $X \pm SD$ ), correspondentes à resposta proliferativa dos esplenócitos, avaliada na presença de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$  de Lc9, 10  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas de lisado de *L. chagasi* ou 0,8  $\mu\text{g/mL}$  de Cona, são mostrados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

A comparação da resposta proliferativa entre os grupos de camundongos foi realizada usando-se os valores de índice de proliferação (IP; razão entre os valores de cpm obtidos pelo cultivo na presença de antígenos de *Leishmania* ou Con A e os valores de cpm obtidos na ausência dos antígenos ou do mitógeno).

Os valores de índice de proliferação de esplenócitos, cultivados na presença das três concentrações distintas de Lc9 ou de lisado de *Leishmania*, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos (dados não mostrados e Figura 5A, Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Contudo, esplenócitos de camundongos dos grupos G4, G5, G6, G7 e G8 apresentaram uma tendência à proliferação na presença de Lc9 quando comparados com animais dos grupos G1, G2 e G3 (Figura 7A;  $p > 0,05$ ).

Por outro lado, Con A induziu a proliferação das células esplênicas de cada um dos grupos de camundongos (Figura 7B), mostrando que as condições do ensaio estavam adequadas.

**Tabela 1.** Valores de cpm ( $X \pm SD$ ) obtidos após cultivo de células esplênicas com meio de cultura apenas ou com antígeno recombinante Lc9.

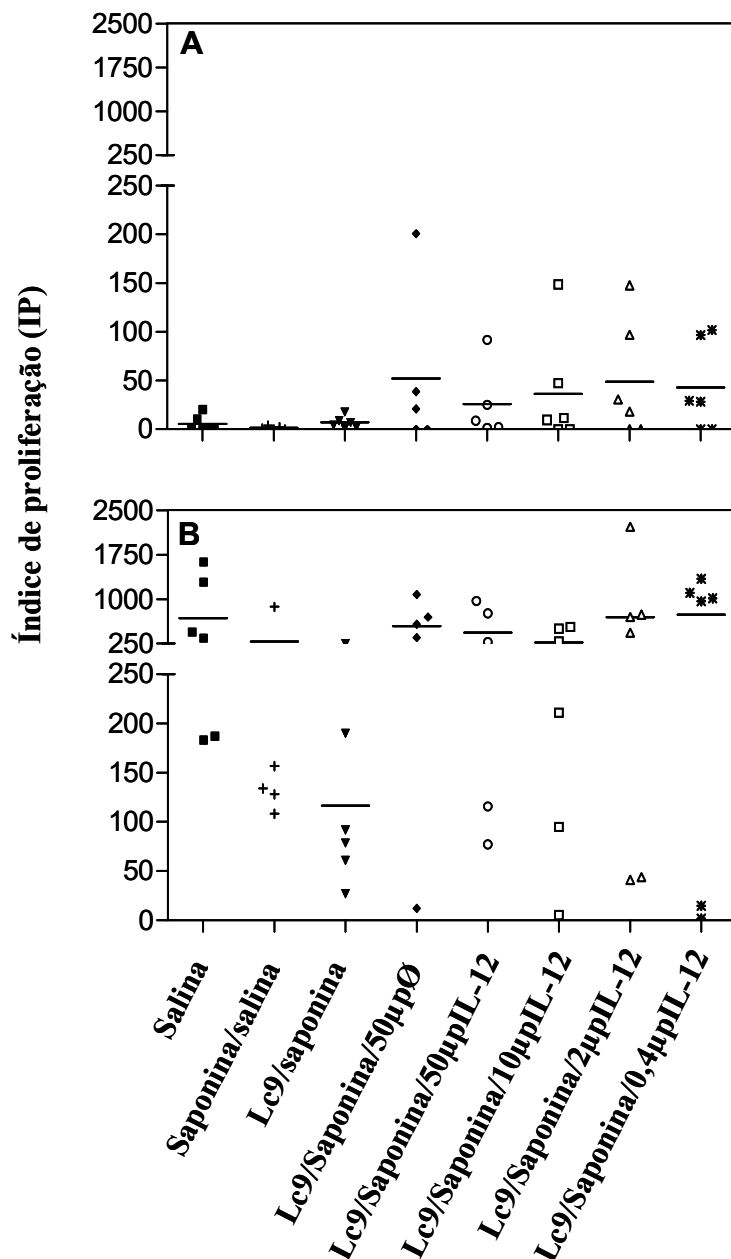
| Grupos de animais | Meio de Cultura   | Lc9 a<br>0,1 $\mu\text{g/mL}$ | Lc9 a<br>1 $\mu\text{g/mL}$ | Lc9 a<br>10 $\mu\text{g/mL}$ |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| G1                | 5298 $\pm$ 7969   | 2767 $\pm$ 2931               | 1736 $\pm$ 745              | 2237 $\pm$ 1591              |
| G2                | 9820 $\pm$ 12455  | 8787 $\pm$ 10712              | 4963 $\pm$ 5025             | 2763 $\pm$ 1440              |
| G3                | 2983 $\pm$ 2154   | 11492 $\pm$ 9756              | 16408 $\pm$ 13373           | 20705 $\pm$ 14573            |
| G4                | 555 $\pm$ 271     | 6762 $\pm$ 8362               | 12929 $\pm$ 15905           | 14604 $\pm$ 18112            |
| G5                | 16512 $\pm$ 23825 | 15933 $\pm$ 14721             | 21084 $\pm$ 9916            | 17033 $\pm$ 13285            |
| G6                | 13364 $\pm$ 19364 | 20530 $\pm$ 9861              | 27021 $\pm$ 15440           | 21128 $\pm$ 16728            |
| G7                | 8602 $\pm$ 12352  | 11682 $\pm$ 4114              | 19227 $\pm$ 10523           | 19770 $\pm$ 15745            |
| G8                | 13894 $\pm$ 18416 | 19568 $\pm$ 9201              | 18281 $\pm$ 6898            | 18693 $\pm$ 15903            |

**Tabela 2.** Valores de cpm ( $X \pm SD$ ) obtidos após cultivo de células esplênicas com meio de cultura apenas ou com lisado de *L. chagasi*.

| Grupo de animais | Meio de cultura | Lisado de<br><i>L. chagasi</i> (10 $\mu\text{g/mL}$ ) |
|------------------|-----------------|---|
| G1               | 342 $\pm$ 315   | 616 $\pm$ 322   |
| G2               | 524 $\pm$ 441   | 829 $\pm$ 528   |
| G3               | 2352 $\pm$ 2703 | 4892 $\pm$ 5781                                       |
| G4               | 502 $\pm$ 498   | 731 $\pm$ 314   |
| G5               | 1455 $\pm$ 1909 | 2154 $\pm$ 2133                                       |
| G6               | 1339 $\pm$ 1149 | 2059 $\pm$ 1230                                       |
| G7               | 1130 $\pm$ 881  | 1167 $\pm$ 890  |
| G8               | 306 $\pm$ 290   | 355 $\pm$ 409   |

**Tabela 3.** Valores de cpm ( $X \pm SD$ ) obtidos após cultivo de células esplênicas com meio de cultura apenas ou com Con A.

| Grupo de animais | Meio de cultura | Cona a 0,8 $\mu$ g/mL |
|------------------|-----------------|-----------------------|
| G1               | 185 $\pm$ 89    | 81483 $\pm$ 30031     |
| G2               | 473 $\pm$ 225   | 81043 $\pm$ 24923     |
| G3               | 969 $\pm$ 593   | 75808 $\pm$ 15542     |
| G4               | 253 $\pm$ 185   | 65092 $\pm$ 38789     |
| G5               | 651 $\pm$ 639   | 80016 $\pm$ 41532     |
| G6               | 687 $\pm$ 823   | 99712 $\pm$ 21566     |
| G7               | 622 $\pm$ 867   | 65972 $\pm$ 42611     |
| G8               | 490 $\pm$ 819   | 63618 $\pm$ 26352     |



**Figura 7.** Avaliação da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c, realizada conforme descrito em Material e Métodos. Grupos de camundongos foram injetados três vezes com salina (G1), saponina em salina (G2), Lc9 e saponina (G3, G4, G5, G6, G7 e G8), por via subcutânea. Durante a primeira série de injeções, os animais receberam pcDNA3.1 vazio [50 µg por animal(G4)] ou pcDNA3.1-scmuIL-12 [50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) e 0,4 µg (G8) por animal] por via intramuscular seguida de eletroporação. A estimulação foi realizada com 10µg/mL de Lc9 por cinco dias (A) ou 0,8 µg/mL de Concanavalina A por 3 dias (B) e pulsadas com timidina tritiada durante 18 horas. A proliferação celular está representada pelo valor do índice de proliferação (IP). Os símbolos representam os valores encontrados para cada animal e as barras a média aritmética dos grupos. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.2.2 Avaliação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ IL-4, IL-5) pelo método de ELISA

Para a avaliação da produção de IFN- $\gamma$ , o sobrenadante do cultivo celular foi utilizado individualmente, enquanto que para IL-4 e IL-5, utilizou-se a mistura dos sobrenadantes de cada grupo experimental. O valor mínimo de detecção do ensaio foi de 0,234 ng/mL para IFN- $\gamma$  e 39 pg/mL para IL-4 e IL-5 .

Os valores da concentração de IFN- $\gamma$  ( $X \pm SD$ , em ng/ml) em sobrenadantes de esplenócitos, cultivados com 10  $\mu$ g/mL de Lc9, dos grupos salina (G1) ou saponina em salina (G2) foram de:  $0,325 \pm 0,025$  e  $0,372 \pm 0,112$ , respectivamente. Já os valores nos grupos de animais que receberam Lc9 e saponina (G3) ou Lc9, saponina e 50  $\mu$ g pcDNA3.1 (G4) foram de  $4,953 \pm 5,052$  e  $3,082 \pm 2,879$ , respectivamente. Um dos seis animais pertencentes ao grupo G3 apresentou concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante acima do limite máximo de detecção do ensaio e, para a realização da análise estatística, a esse animal foi atribuído o valor máximo, que foi de 15 ng/mL. A administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12, em qualquer das quantidades, 50  $\mu$ g (G5), 10  $\mu$ g (G6), 2  $\mu$ g (G7) ou 0,4  $\mu$ g (G8), em animais injetados com Lc9 e saponina não promoveu intensificação da produção de IFN- $\gamma$ , sendo os valores encontrados:  $1,244 \pm 0,673$ ;  $2,438 \pm 2,214$ ;  $1,336 \pm 0,447$  e  $0,591 \pm 0,233$ , respectivamente. A comparação entre os valores de concentração de IFN- $\gamma$  dos grupos, realizada por Kruskal-Wallis, mostrou diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ . Comparações adicionais, realizadas pelo pós-teste Student-Newman-Keuls (SNK), mostraram que os grupos G3, G4, G5, G6 e G7 produziram IFN- $\gamma$  comparados com os grupos G1 e G2 ( $p < 0,05$ ). Curiosamente, os valores do grupo G8 não foram significativamente diferentes dos grupos G1 e G2.

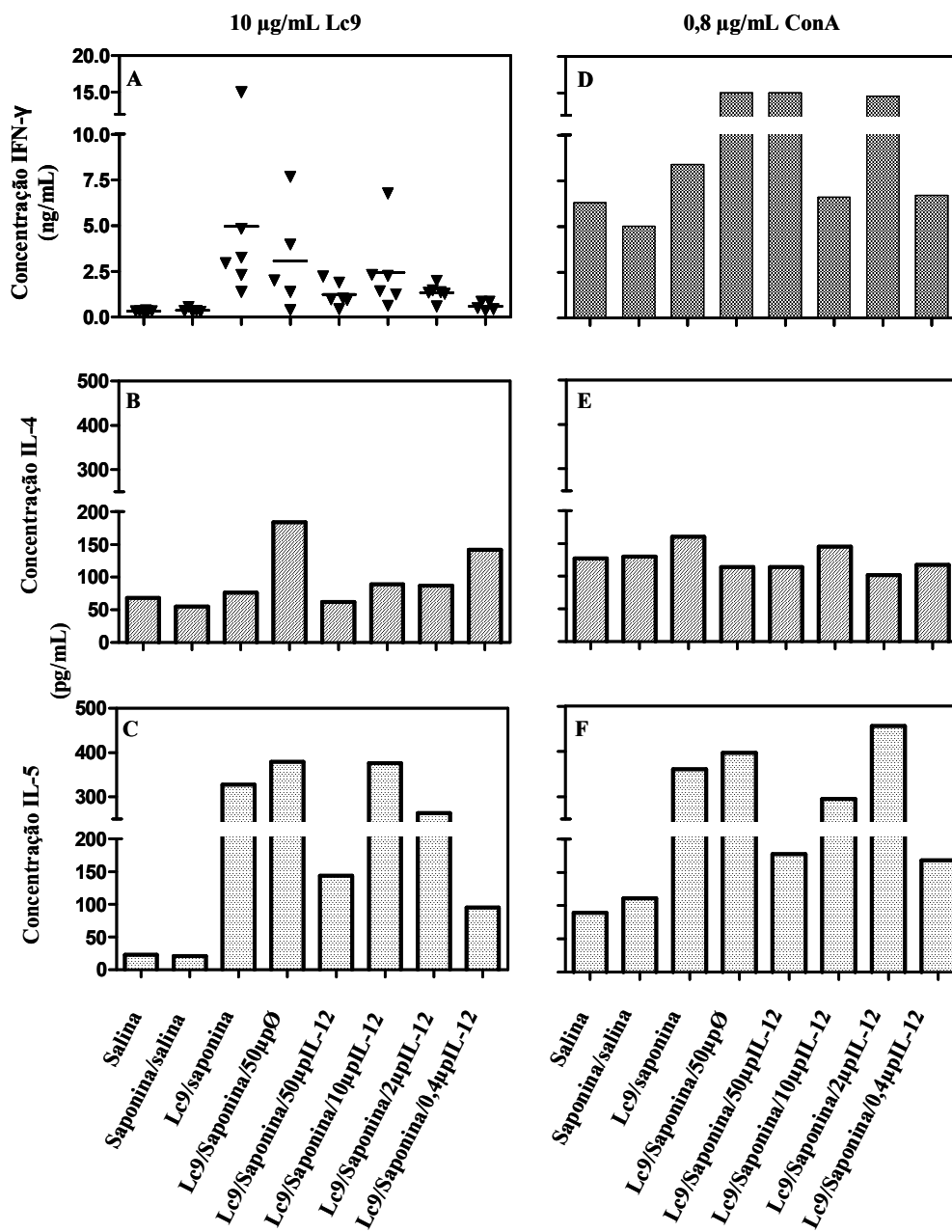
Com relação à produção de IL-4, a concentração encontrada em sobrenadantes de esplenócitos cultivados na presença Lc9, avaliada em uma mistura, foi relativamente baixa nos grupos G1 e G2. Em sobrenadantes dos grupos G3, G5, G6 e G7, IL-4 apresentou concentração parecida com a dos grupos G1 e G2. Somente os grupos G4 e G8 revelaram uma concentração maior de IL-4 na mistura de sobrenadantes. Aparentemente, a administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 não influenciou na produção dessa citocina (Figura 8B).

Interessantemente, concentração de IL-5 foi encontrada elevada na mistura de sobrenadantes de todos os grupos que receberam Lc9 (de G3 a G8), quando comparadas a dos grupos G1 e G2. Contudo, a concentração de IL-5, na mistura de sobrenadantes, de dois grupos (G5 e G8) injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12 parece ser apenas discretamente maior que a dos grupos G1 e G2 (Figura 8C).

Em sobrenadantes de esplenócitos cultivados na presença de 1 µg/mL de Lc9 ou 10 µg/mL de proteínas do lisado de *L. chagasi*, a produção de citocinas (IFN-γ, IL-4, IL-5) foi baixa ou não foi detectada nos grupos.

A estimulação com Con A promoveu a produção das três citocinas ((IFN-γ, IL-4, IL-5) para todos os grupos de animais (figuras 8D, E e F).



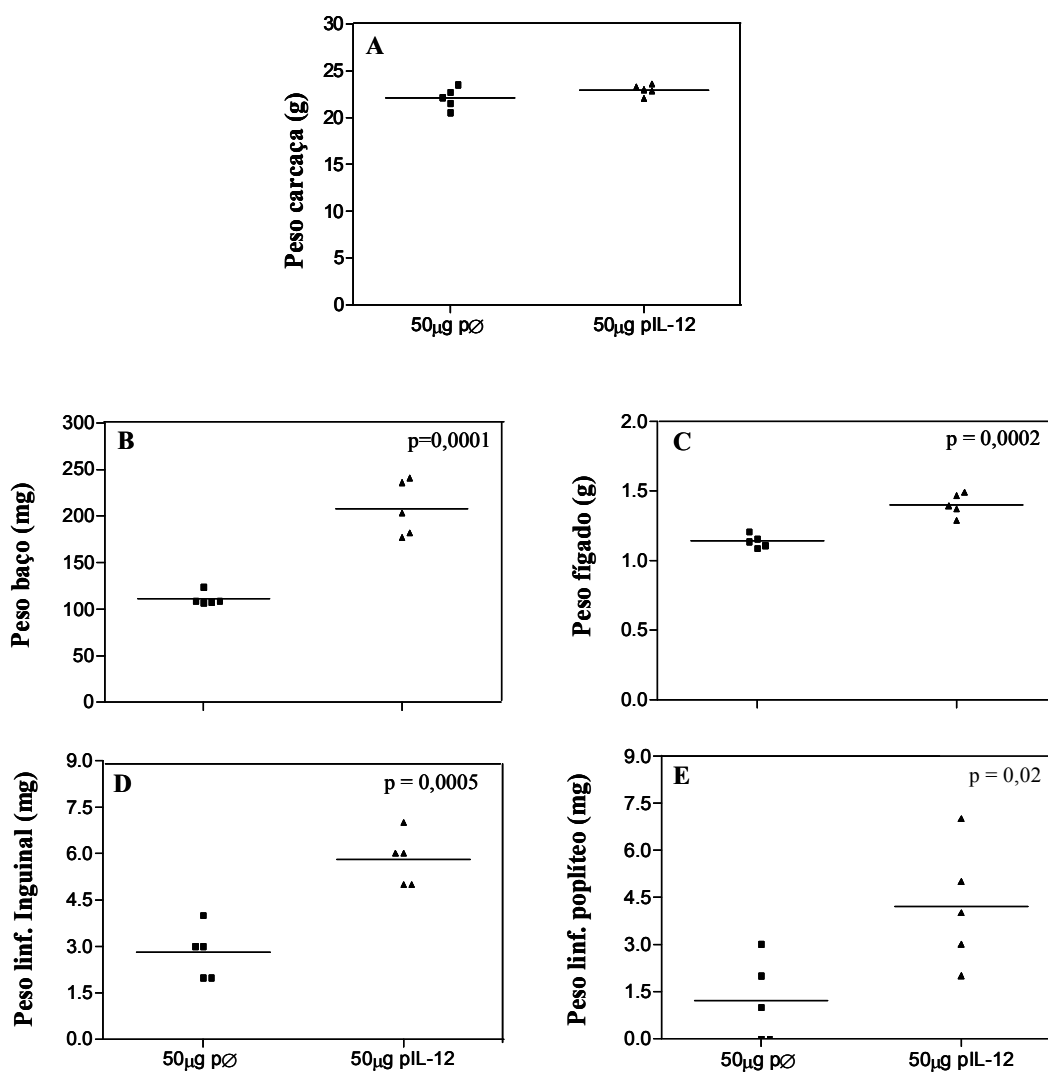


**Figura 8.** Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5. Grupos de camundongos foram injetados três vezes com salina (G1), saponina em salina (G2), Lc9 e saponina (G3, G4, G5, G6, G7 e G8), por via subcutânea. Durante a primeira série de injeções, os animais receberam pcDNA3.1 vazio [50 µg por animal (G4)] ou pcDNA3.1-scmlL-12 [50 µg (G5), 10 µg (G6), 2 µg (G7) e 0,4 µg (G8) por animal] por via intramuscular seguida de eletroporação. A concentração das citocinas (IFN- $\gamma$ , em sobrenadante de cada animal, IL-4 e IL-5, em mistura de sobrenadantes) foi avaliada após cultivo de esplenócitos com Lc9 a 10 µg/mL (figuras A, B e C) ou Con A a 0,8 µg/mL (figuras D, E e F), por 48 h, por ELISA de captura. Os símbolos e as barras representam valores individuais e a média de cada grupo (A). As colunas representam a concentração nas misturas de sobrenadante (figuras B-F). Quanto à produção de IFN- $\gamma$ , a comparação entre os grupos, realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). O pós-teste SNK revelou diferença entre os grupos G3, G4, G5, G6 e G7 com relação aos grupos controles G1, G2 e G8.

#### 5.4. Avaliação de efeitos da administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação

A administração de plasmídeos, com insertos codificando proteínas recombinantes, por eletroporação, pode resultar em uma grande produção dos polipeptídios codificados pelos insertos (MIR *et al.*, 1999; LUCAS; HELLER, 2000). A injeção de grandes quantidades de IL-12 pode promover alterações teciduais e induzir supressão imunológica (KOBUSH *et al.*, 2005; KURZAWA *et al.*, 1998).

Para a obtenção de informações sobre possíveis alterações teciduais, indicativas de toxicidade, conseqüentes a administração do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, camundongos BALB/c foram injetados com 50 µg pcDNA3.1-scmu-IL-12 ou 50 µg pcDNA3.1 vazio (controle negativo) por via intramuscular seguida de eletroporação. Os animais injetados com pcDNA3.1-scmu-IL-12 apresentaram um aumento, estatisticamente significante, do fígado, baço, linfonodo inguinal e linfonodo poplíteo (Figura 7, Teste t não pareado,  $p < 0.05$ ).



**Figura 9.** Avaliação do peso da carcaça, baço, fígado e linfonodos inguinal e poplíteo de camundongos BALB/c. Os animais foram injetados, por via muscular, com 50 µg pcDNA3.1 vazio (pØ) ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 (pIL-12) e, em seguida, foram submetidos a eletroporação. Dez dias após a injeção dos plasmídeos os animais foram sacrificados e o peso da carcaça e dos órgãos foi determinado. Os símbolos e as barras representam valores individuais e a média aritmética dos grupos. A comparação entre os grupos foi realizada com Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Visando obtenção de antígenos recombinantes a serem avaliados como candidatos a componentes de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, em nosso laboratório, foi confeccionada uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) da forma amastigota de *L. chagasi* em fago lambda. A partir dessa biblioteca, através de uma mistura de soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, inicialmente, foram selecionados trinta clones de fago recombinante, sendo o inserto de um deles denominado Lc9. Após excisão do fago para geração do plasmídeo pBK-CMV e subclonagem do inseto em plasmídeo pRSET, a construção pRSETB-Lc9 foi produzida. Essa construção é capaz de promover super-expressão de uma proteína de fusão, com uma cauda de histidinas na extremidade amina seguida da proteína Lc9, em bactérias *E.coli*BL21(DE3)pLysS.

Em experimentos realizados por nosso grupo, cães injetados três vezes com Lc9, Lc13 e saponina apresentaram uma resposta imune humoral específica, com produção de anticorpos reativos a Lc9, Lc13 e proteínas do lisado de *L. chagasi*, confirmando a imunogenicidade de Lc9 para o cão (SANTOS, 2007). Além disso, camundongos BALB/c injetados três vezes com Lc9 desenvolveram uma resposta imune Th2, com geração de anticorpos específicos da subclasse IgG1, produção de IL-5, ausência de resposta proliferativa e síntese de IFN- $\gamma$ , após estimulação com Lc9 *in vitro*. Contudo, quando Lc9 foi administrada em associação com saponina, os animais exibiram uma resposta mista Th1/Th2, tendo sido observadas a produção IgG2a, IgG1, IFN- $\gamma$ , IL-5 e linfoproliferação de esplenócitos, sugerindo um desvio parcial da resposta imune em direção a Th1 (FRAGA, 2007).

Embora a resposta imune protetora contra a LV canina ainda não tenha sido extensamente caracterizada, provavelmente, tal resposta deve ser celular do tipo Th1, com produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  (PINELLI *et al.*, 1994, 1995, RHALEM *et al.*, 1999) e baixa produção de IL-10, IL-4 e TGF-beta, contra antígenos produzidos pelo parasito durante a infecção. Portanto, durante o processo de desenvolvimento de uma vacina contra LV, a identificação de protocolos de imunizações capazes de induzir de resposta imune específica do tipo Th1 é desejada.

No presente trabalho, visando à definição de condições apropriadas para indução de resposta imune do tipo Th1 a antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*, foram avaliadas diferentes doses de plasmídeo codificando IL-12 (pcDNA3.1-scmu-IL-12) co-administradas com Lc9 e saponina. Nesse estudo, os camundongos injetados com salina (G1) ou saponina em salina (G2) foram usados como controles negativos nos ensaios para avaliação da produção de anticorpos específicos, da classe e IgG e subclasses IgG2a e IgG1, e para a avaliação da resposta proliferativa e produção de citocinas, após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania*. Em comparação com os animais dos grupos G1 e G2, os camundongos injetados com Lc9 e saponina (G3) ou Lc9, saponina e pcDNA3.1, utilizados como controles de indução de resposta imune mista Th1/Th2 (ver resultados prévios descritos acima), revelaram a produção de anticorpos específicos, da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1 (Figuras 3 e 4), falharam em exibir resposta linfoproliferativa, mas sintetizaram IFN- $\gamma$  e de IL-5 após estimulação *in vitro* com Lc9, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta imune mista. Os camundongos injetados com Lc9, saponina e pcDNA3.1-scmu-IL-12, em qualquer das doses utilizadas [50  $\mu$ g (G5), 10  $\mu$ g (G6), 2  $\mu$ g (G7) e 0,4  $\mu$ g (G8) de DNA por animal], exibiram produção de anticorpos específicos (IgG, IgG2a e IgG1), falharam em apresentar resposta linfoproliferativa específica, produziram IFN- $\gamma$  (com exceção do grupo G8) e IL-5 (em baixa intensidade nos grupos G5 e G8). Esses dados sugerem que a administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação, em qualquer das quantidades de plasmídeo usadas, em camundongos injetados com Lc9 e saponina, falhou em promover um desvio importante na direção de uma resposta imune Th1.

Como a administração de pcDNA3.1-scmu-IL-12 foi realizada por eletroporação e, esse procedimento, poderia promover a produção de grandes quantidades de IL-12 (LUCAS, HELLER *et al.*, 2001) nos animais proporcionando efeitos indesejáveis, um experimento foi realizado para determinar se a dose mais alta de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (50  $\mu$ g por animal) utilizada no experimento de imunização era segura.

Em experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, após o processo de purificação de Lc9, essa proteína foi identificada por “Western blot” com uma mistura de soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* ou um anticorpo monoclonal anti-histidina como uma banda com mobilidade relativa de 39 kDa. (RODRIGUES, 2004). Para

a realização do presente trabalho, a proteína recombinante Lc9, produzida em *E. coli* como uma proteína de fusão que possui uma cauda de seis histidinas na extremidade amina, foi purificada com sucesso por cromatografia de afinidade, utilizando-se colunas de “Sepharose” quelada ao níquel. A proteína purificada apresentou uma banda proeminente com mobilidade relativa correspondente 39 kDa em gel de poliacrilamida com SDS corado por azul de Commassie (Figura 3).

Vários estudos têm demonstrado uma associação da produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a e o padrão de resposta imune encontrada em camundongos. A produção de anticorpos da subclasse IgG2a está associada a uma resposta Th1, enquanto que a de IgG1 a uma resposta Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986; GURUNATHAN *et al.*, 1997; SJÖLANDER *et al.*, 1998; GHOSH *et al.*, 2002).

No presente estudo, a resposta celular foi avaliada pelo ensaio de linfoproliferação de esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (Lc9 e lisado de *L. chagasi*). Todos os grupos de animais apresentaram resposta linfoproliferativa após estimulação com Con A e falharam em exibir resposta após a estimulação com lisado de *Leishmania*.

Os grupos de animais injetados com Lc9, saponina e pcDNA3.1-scmu-IL-12 (G5 a G8) apresentaram índices de proliferação de 5 a 8 vezes maior quando comparados com os grupos controle que não receberam o antígeno G1 e de 25 a 40 vezes quando comparados com G2, no entanto essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Curiosamente, dos grupos de animais injetados com Lc9 e saponina, sem pcDNA3.1-scmu-IL-12, o grupo G3 não apresentou resposta linfoproliferativa mas o grupo G4 exibiu um índice de proliferação 10 vezes maior que os grupos G1 e 50 vezes que o G2. Contudo, as diferenças na resposta linfoproliferativa mencionadas não foram estatisticamente significantes. Parte desses dados contrasta com achados obtidos em dois outros experimentos, realizados previamente por nosso grupo, nos quais a administração da combinação Lc9 e saponina, realizada sob as mesmas condições do grupo G3 do presente trabalho, promoveu proliferação celular frente à estimulação com o antígeno recombinante Lc9, quando comparado com grupos de animais injetados com salina ou L9 associados a outros adjuvantes (DOS SANTOS *et al.*, manuscrito em preparação).

A resposta imune celular também foi avaliada através da produção de citocinas por esplenócitos após estimulação *in vitro* com Lc9 ou Con A. Após a estimulação com Con A, todos os grupos de camundongos produziram grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , quantidades de baixa a moderadas de IL-4. Além disso, todos os grupos, com exceção de G1 e G2 que produziram baixa quantidade, revelaram uma produção de moderada a alta de IL-5.

Após a estimulação *in vitro* com Lc9, os animais que receberam Lc9 e saponina (G3) produziram IFN- $\gamma$ , sendo que 1 dos 6 animais exibiu concentração acima do valor máximo de detecção do ensaio (15 ng/ml). Dados similares foram encontrados em dois experimentos realizados por nosso grupo. Os grupos G4, G5, G6 e G7 também apresentaram produção de IFN- $\gamma$ , quando comparados com os grupos controle negativos G1 e G2 (Figura 8, teste de Kruskal-Wallis e teste SNK,  $p < 0,05$ ). Contudo, a produção de IFN- $\gamma$  não foi intensificada pelo uso de IL-12 com nenhuma das doses administradas (comparação entre G3 ou G4 com G5, G6, G7 ou G8). Apesar de não ter sido realizada a estatística quanto à produção de IL-4 e IL5 pelo fato de ter sido utilizada a mistura dos sobrenadante do cultivo celular, sugere-se que os camundongos imunizados com Lc9 e saponina (G3) apresentaram produção de IL-5. Em dois outros experimentos, realizados anteriormente por nosso grupo, achados semelhantes foram observados. Interessantemente, os grupos de animais injetados com Lc9 e saponina, em associação com pcDNA3.1-scmu-IL-12 não apresentaram inibição completa na produção de IL-5. Embora a concentração dessa citocina nos grupos G5 e G8 tenha sido menor que a dos grupos G3 e G4, os valores observados são superiores aos obtidos nos grupos G1 e G2. Com relação a IL-4, a produção dessa citocina nos grupos que receberam Lc9 (G3 a G8) foi parecida com a dos grupos controles (G1 e G2), com exceção (G4 a G8) que revelaram maior concentração da citocina por razões desconhecidas.

O ensaio de ELISA parece não ser o método mais adequado para mensuração da concentração de IL-4 em sobrenadante do cultivo celular, após estimulação *in vitro*. Mais apropriado teria sido mensurar IL-4 através de ELISPOT. Ewen e Baca-Estrada (2001) compararam ELISA e ELISPOT na mensuração de IL-4 produzido por esplenócitos de camundongos C57BL/6 e BALB/c imunizados com uma glicoproteína D (gD) purificada de herpesvírus bovino ou com leucotoxina recombinante (Lkt) e estimulados *in vitro* com gD

ou Lkt. De acordo com esses autores, não houve uma concordância entre os dados encontrados pelo dois métodos utilizados. Isso se deve ao fato de que, que a IL-4 produzida em cultura de linfócitos se liga rapidamente ao seu receptor, tornando-se indisponível no sobrenadante, que é utilizado em ELISA. Por outro lado, quando essa citocina é produzida e imediatamente imobilizada como ocorre no ELISPOT, a mensuração de IL-4 torna-se mais precisa.

A utilização da saponina pode ter contribuído para a produção das citocinas IL-4 e IL-5, uma vez que estudos presentes na literatura têm demonstrado o desenvolvimento de uma resposta Th2 quando saponina é utilizada com adjuvante (TADOKORO *et al.*, 2006). A utilização IL-12 com o antígeno (Lc9) associado à saponina não foi capaz de suprimir a produção de citocinas características de uma resposta imune Th2. Uma alternativa seria utilizar IL-12 associada apenas à Lc9.

De acordo com os dados encontrados no presente trabalho, todos os grupos que receberam Lc9 apresentaram uma resposta mista Th1/Th2, com produção tanto de IgG1, IgG2a, IFN- $\gamma$  e IL-5. Nenhuma das doses de IL-12 utilizadas neste trabalho foi, portanto, capaz de promover um desvio para Th1 da resposta imune em animais injetados com Lc9 e saponina.

IL-12 é uma citocina produzida principalmente por células apresentadores de antígeno e que exibe várias funções, incluindo a de promover de diferenciação de células T CD4 para Th1 (TRINCHIERI, 2003). Vários autores relataram que IL-12 (ou plasmídeo codificando IL-12) pode promover intensificação ou desvio para uma resposta imune Th1 quando co-administrada com alguns antígenos (SYPEK *et al.*, 1993; AFONSO *et al.*, 1994; GURUNATHAN *et al.*, 1998; YAMAKAMI *et al.*, 2001; TEWARY *et al.*, 2006). Por essas razões, é surpreendente que os animais injetados com Lc9, saponina e pcDNA3.1-scmu-IL-12 não tenham desenvolvido uma resposta imune Th1.

Embora as razões pelas quais IL-12 falhou em induzir uma resposta imune Th1, no presente trabalho, ainda sejam desconhecidas, várias possibilidades poderiam ser aventadas para explicar os resultados aqui apresentados, como por exemplo: 1) a qualidade ou a quantidade do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 injetada ter sido insuficiente, 2) o pcDNA3.1-scmu-IL-12 ter sido injetado apenas na primeira dose de imunização; 3) a resposta imune induzida por Lc9 e saponina já resulta na máxima produção de IL-12



possível e, por isso, o fornecimento adicional de IL-12, através da administração do pcDNA3.1-scmu-IL-12, não seria capaz de promover um desvio adicional da resposta imune, 4) as vias de administração de Lc9 e saponina (subcutânea, no dorso) e pcDNA3.1-scmu-IL-12 (intramuscular, no membro inferior) não proporcionaram o encontro de células apresentadoras de antígeno, antígenos, adjuvante e IL-12 em quantidades adequadas em um mesmo órgão linfóide (linfonodo de drenagem). Algumas dessas possibilidades serão discutidas abaixo.

O plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, usado nos experimentos aqui descritos, foi obtido em nosso laboratório a partir da subclonagem do inserto do plasmídeo pCI-neo-IL-12, gentilmente cedido pela Dra. Emanuela Handman (Eliza and Walter Institute, Melbourne, Austrália, Noormohammadi *et al.*, 2001). A análise da seqüência do inserto do pcDNA3.1-scmu-IL-12 revelou substituição de um nucleotídeo em quatro códons diferentes, em relação ao inserto da construção plasmideal pCI-neo-IL-12, sendo que a substituição em um dos códons foi feita de modo deliberado para introdução da seqüência Kozak (KOZAK, 1986), para favorecer síntese da proteína recombinante em células de mamífero. As outras três substituições de nucleotídeo foram introduzidas, não intencionalmente, provavelmente durante a PCR realizada no processo de subclonagem, são conservadas e não implicam em alterações de aminoácido da cadeia polipeptídica. A atividade biológica da IL-12 codificada pelo plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 foi demonstrada em experimentos prévios, no quais a concentração de IFN- $\gamma$  foi avaliada no soro de camundongos BALB/c injetados com 50  $\mu$ g de plasmídeo por animal, com pcDNA3.1 vazio ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 e, depois, submetidos a eletroporação, ou ainda, pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação. Nesses experimentos, sete dias após a administração dos plasmídeos, os animais que receberam pcDNA3.1 vazio por eletroporação ou pcDNA3.1-scmu-IL-12 sem eletroporação apresentaram valores abaixo ou próximos ao limite inferior de detecção do ensaio (15 pg/ml), enquanto que os camundongos que receberam pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação exibiram cerca de 3 ng/ml de IFN- $\gamma$  (BARROUIN-MELLO *et al.*, dados não publicados). Além disso, preparações dos plasmídeos utilizadas no presente trabalho apresentavam boa qualidade, relação de densidade óptica a 260/280 nm de 1,9 e bandas bem definidas em gel de agarose,

indicando a integridade do DNA plasmideal. Com esses resultados seria improvável que a falha no desvio da resposta imune, mencionado previamente, decorra da qualidade da preparação do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 utilizada.

A eletroporação para a administração do plasmídeo foi utilizada para promover a produção de IL-12 em uma quantidade suficientemente grande para ser capaz de influenciar a resposta imune induzida por Lc9 e saponina. A eletroporação envolve a aplicação de pulsos elétricos com a finalidade de aumentar a permeabilidade celular e o trânsito de polinucleotídeos através da membrana celular. Esses pulsos elétricos abrem poros na membrana pelos quais polinucleotídeos, ou outras macromoléculas de interesse, podem passar para alcançar o interior das células. Mais tarde os poros são fechados e as moléculas aprisionadas podem exercer efeitos biológicos (SOMIARI *et al.* 2000). Vários fatores podem influenciar na eficiência de transfecção de plasmídeos administrados por eletroporação, incluindo fatores relacionados aos pulsos elétricos aplicados (MIR *et al.*, 1999). Aqui, foram usados pulsos elétricos com características referidas como ótimas para transfecção em tecido muscular de camundongos (LUCAS, HELLER, 2001). Dez dias após a administração de 50 µg do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12, por camundongo, por eletroporação foi observado um aumento considerável do fígado, baço, linfonodo inguinal e linfonodo poplíteo (Figura 9), comparado com animais injetados com pcDNA3.1 vazio e submetidos a eletroporação, sugerindo uma grande produção de IFN-γ (LUCAS, HELLER, 2001). Esses resultados sugerem que a maior dose de plasmídeo utilizada, na verdade, é tóxica e que, provavelmente, a falta de desvio da resposta imune não está relacionada à quantidade de IL-12 produzida pelo menos nesse grupo.

Uma outra possibilidade para explicar os resultados mencionados acima seria que, durante o processo de imunização, o plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 foi administrado somente na primeira série de injeções, portanto, o número de doses teria sido insuficiente. Em um estudo prévio, quando camundongos BALB/c foram injetados três vezes com Lc9 e 50 µg de pcDNA3.1A-scmu-IL-12 por eletroporação, a resposta imune não diferiu significativamente daquela induzida pela administração de Lc9 isoladamente, que foi do tipo Th2 (FRAGA, 2007). Embora não possamos afastar a possibilidade de que camundongos injetados com Lc9, saponina e doses menores de pcDNA3.1-scmu-IL-12 (como por exemplo, 10 µg, 2 µg ou 0,4 µg) induzam resposta Th1, quando usadas duas ou

três vezes, alguns autores sugerem que a administração de IL-12 durante o reforço da imunização pode não ser benéfica para a indução desse tipo de resposta (GHERARDI, *et al.*, 2000).

A resposta imune induzida por Lc9 e saponina poderia ser muito intensa, levando a ocupação os receptores de IL-12 em tal nível nos linfonodos de drenagem do antígeno, que o fornecimento adicional de IL-12, conseqüente à administração do plasmídeo pcDNA3.1-scmu-IL-12 por eletroporação, poderia não resultar em efeito aditivo.

Bliss e colaboradores (1996) injetaram em camundongos BALB/c e C57Bl/6 um hapteno (2,4,6-trinitrofenil, TNP) conjugado a uma proteína carreadora (“keyhole limpet hemocyanin”, KLH) e IL-12 murina recombinante por via subcutânea, e fizeram um reforço da imunização com TNP-KLH por via intraperitoneal. Na resposta primária, os animais apresentaram desenvolvimento de células do tipo Th1, com produção de IFN- $\gamma$  após estimulação *in vitro* e anticorpos séricos da subclasse IgG2a específicos para TNP, comparados com camundongos injetados exclusivamente com TNP-KLH que revelaram resposta Th2. Contudo, na resposta secundária, os animais injetados com TNP-KLH e IL-12, exibiram uma resposta mista Th1/Th2. Por isso, os autores sugeriram que IL-12 pode suprimir a resposta primária, mas não necessariamente, a resposta de memória do tipo Th2.

Alguns estudos demonstraram que IL-12, na forma de DNA plasmideal, pode atuar como potente indutor de uma resposta imune do tipo Th1, com produção predominantemente de IFN- $\gamma$  (YAMAKAMI *et al.*, 2001; SALDARRIAGA, *et al.*, 2006; TEWARY *et al.*, 2006). Entretanto, curiosamente, em outros estudos, quando IL-12 na forma de DNA plasmideal foi administrada em camundongos, os autores observaram supressão da resposta Th1, provavelmente decorrente da indução de apoptose de células T devido a altas concentrações de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico gerados (KOBLISH *et al.*, 1998; LASARTE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001).

Com base dados descritos na literatura científica, as conseqüências da administração de IL-12 podem variar na dependência da quantidade e o número de doses utilizadas e o processo de otimização do seu uso pode ser difícil de ser conseguida.

## 7. CONCLUSÕES

Os dados encontrados no presente trabalho sugerem que:

- O antígeno recombinante da forma amastigota de *L. chagasi* (Lc9) utilizado é imunogênico no modelo murino gerando uma forte resposta humoral, caracterizada pela presença de anticorpos reativos a Lc9;
- O ensaio de linfoproliferação não demonstrou ser um bom parâmetro para a avaliação da resposta imune celular, uma vez que não houve diferença na proliferação dos esplenócitos por nenhum dos grupos experimentais testados;
- A utilização do antígeno recombinante associado à saponina induziu uma resposta imune mista Th1/Th2, estando de acordo com resultados obtidos em outros dois experimentos;
- A resposta induzida pela administração de Lc9-saponina não foi modificada para predominantemente Th1 por nenhuma das doses de IL-12 associada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEICAO-SILVA, F. M. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, 77: 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.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infect. Immun.**, 70: 2763-2771, 2002.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, 30(12-13):1269-81, 2000.
- 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 leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, 106: 315-324, 2002.
- BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human\_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31(1):149-155, 1998.
- BARROUIN-MELO, S. M., D. F. LARANGEIRA, J. TRIGO, P. H. AGUIAR, W. L. DOS-SANTOS et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 195-197, 2004.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 55: 273-277, 1996.
- 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: 887-894, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003. 120p.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**; 45(2): 79-83, 2003.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D. JR. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, 165(3):535-540.1992.

CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, W. D. JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, 76(6):2066-2069, 1985.

CHEN, H. W., C. H. PAN, H. W. HUAN, M. Y. LIAU, J. R. CHIANG et al., 2001  
Suppression of immune response and protective immunity to a Japanese encephalitis virus DNA vaccine by coadministration of an IL-12-expressing plasmid. *J Immunol* 166: 7419-7426

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.** 141: 539-543, 1997

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, 186(9):1314-1320, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. **Hospital (Rio de Janeiro)**. 11: 3-9, 1937.

DE ANDRADE T. M.; TEIXEIRA, R.; DE PEREIRA, C.; DE CARVALHO FILHO, E. M. Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo**, 24(5):298-302, 1982.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara. **Hospital (Rio de Janeiro)** 45: 703-707/1954, 1954.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 95(3):239-243, 2001.

D'OLIVEIRA JÚNIOR, A.; COSTA, S. R. M.; BARBOSA, A. B.; ORGE, M. G.; CARVALHO, E. M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92(1):15-20, 1997.

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. S. 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.

DOS SANTOS, L. R.; FRAGA, R. E.; MELO, C. G.; RODRIGUES M. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G. S. Evaluation of different protocols in the attempt to modulate the murine immune response towards a new recombinant antigen candidate for a vaccine against canine visceral leishmaniasis. Manuscrito em preparação.

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

EVANS, T.; REIS, M. F. F. E.; ALENCAR, J. E.; NAIDU, T. G.; JESUS, J. A. L.; McAULIFFE, J. A. F.; PEARSON, R. D. American visceral leishmaniasis (kala-azar). **West. J. Méd.**, 142: 777-781, 1985.

EWEN, C.; BACA-ESTRADA, M. E. Evaluation of interleukin-4 concentration by ELISA is influenced by the consumption of IL-4 by cultured cells, **J Interferon Cytokine Res.**, 21(1):39-43, 2001

FERRER, M. L. **Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis Forum.** Barcelona: Hoechst Roussel, 1999.

FRAGA, R. E. **Avaliação da resposta imune murina após imunização com um antígeno recombinante de *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* em associação com diferentes adjuvantes.** 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GARG, R.; DUBE, A. Animals models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, 123: 439-454, 2006.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.** 56: 58-66, 1984.

GHERARDI, M. M.; RAMIREZ, 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.**, p. 6278–6286, July, 2000.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, **92**(1):324-329, 1993.

GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, **20**: 59-66, 2002.

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

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

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J., PERIBÁÑEZ, M. A.; MOLINA, R.; GRACIA, M. J.; CASTILLO, J.A., Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop.** **77**, pp. 203–207. 2000.

GUBLER, U.; CHUA, A. O.; SCHOENHAUT, D. S.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, R.; NABAVI, N.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; FAMILLETTI, P. C.; GATELY, M. K. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**(10):4143-4147, 1991.

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.

GURUNATHAN, S.; SACKS, D. L.; BROWN, D. R.; REINER, S. L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R. A. Vaccination with DNA Encoding the Immunodominant LACK Parasite Antigen Confers Protective Immunity to Mice Infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **186**(7): 1137–1147, 1997.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**(2):229-43, 2001.



- HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, 177(5):1505-1509, 1993.
- 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.
- KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J. A.; EL HASSAN, A. M.; THEANDER, T. G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, 65(1-2):105-8, 1999.
- KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.** 170(3): 827-45, 1989.
- KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, 201: 239-253, 2004.
- 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):311-8, 1994.
- KOBLISH, H. K.; HUNTER, C. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; LEE, W. M. Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. **J Exp Méd**, 188(9):1603-10, 1998.
- KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU Z. S.; SARIDOMICHELAKIS M. N.; ARGYRIADIS D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 5:376-383, 1999.
- KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, 44(2):283-292, 1986.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227 (5259): 680-685, 1970.
- LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, 266(5603):628-630, 1977.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 81(3):517, 1987.
- LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl). **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, 54(3):277-295, 1979.
- LASARTE, J. J., F. J. CORRALES, N. CASARES, A. LOPEZ-DIAZ DE CERIO, C. QIAN et al., 1999 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: 5270-5277.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275, 1951.
- LUCAS, M. L.; HELLER, R. Immunomodulation by Electrically Enhanced Delivery of Plasmid DNA Encoding IL-12 to Murine Skeletal Muscle. **Molecular Therapy**, 3(1): 47-53, 2001.
- LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 104(22):9375-80, 2007.
- MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, 119(3): 237-46, 1999.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, 16: 188-189, 2000.
- MCADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Infectious Diseases. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.343-414
- MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet. Parasitol.**, 47(1-2):67-76, 2007.

MIR, L. M.; BUREAU, M. F.; GEHI, J.; RANGARA, R.; ROUY, D.; CAILLAUD, J. M. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 4262–4267, 1999.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 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.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, 136(7):2348-57, 1986.

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.

MOHAMED, H. S.; IBRAHIM, M. E.; MILLER, E. N.; WHITE, J. K.; CORDELL, H. J.; HOWSON, J. M. M.; PEACOCK, C. S.; KHALIL, E. A. G.; HASSAN, A. M.; BLACKWELL, J. M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. **Eur. J. Hum. Genet.** 12: 66-74, 2004.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.**, 88(4): 491-493, 1994.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, 174(8):4916-4923, 2005.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, 189(4):741-746, 1999.

NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, 158(3):670-689, 1983.

NICOLLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis* 3: 1-26, 1908.

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.

- PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, G. J.; 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.
- PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P. E. C.; LA PLACA, M.; BORGATTI, M. A.; MUSUMECCI, S. Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 69: 60-68, 1975.
- PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q.; JERONIMO, S. M. B. *Leishmania* species: Visceral (Kalazar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. v.2, p.2831-2845.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; 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., R. M. GONZALO, C. J. BOOG, V. P. RUTTEN, D. GEBHARD et al., 1995 *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: 1594-1600
- POZIO, E.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Trop.**, Dec;38(4):383-93, 1981.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, 122(Pt 3):253-261, 2001.
- RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 71(1):69-76, 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.
- RIOUX, J. A., LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum Comp.**, 65: 111-125, 1990.

- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, 16(7): 292-7, 2000.
- RODRIGUES, Márcio Silva. **Contribuição ao estudo da imunogenicidade de duas proteínas recombinantes de *Leishmania chagasi* candidatas a componentes de vacina contra leishmaniose visceral canina**. 2004. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 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.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2002. 265p.
- SANTOS, Patrícia Oliveira Meira. Avaliação da resposta imune em cães após imunização com dois antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* em associação Interleucina IL-12 (IL-12) canina. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 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.
- SOLANO-GALLEGOS, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, 39(2):560-563, 2001.
- 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.
- STENGER, S.; ROLLINGHOFF, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Ann Rheum Dis.**, 60(3): 43-46, 2001.
- 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.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C. L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, **35**(1):63-73, 2005.

SUNDAR, S.; REED, S. G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H. W. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **56**(5):522-525, 1997.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E. H.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin-12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-1802, 1993.

TADOKORO, C. E., M. S. MACEDO and I. A. ABRAHAMSOHN. Saponin adjuvant primes for a dominant interleukin-10 production to ovalbumin and to *Trypanosoma cruzi* antigen. **Immunology** **89**: 368-374, 1996.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G. S.; MARCO A. SILVANY; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; 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** **35**: 51-54, 2007.

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

TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, **24**: 2409-2416, 2006.

TRAVI, B.L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg.**, **64**(3-4):119-24, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, **3**(2):133-146, 2003.

VIDAL, S.; BELOUCHI, A. M.; CELLIER, M.; BEATTY B.; GROS P. Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. **Mamm. Genome** **6**: 224-230, 1995.

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, pp. 81–91, 2001.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 14(5): 361-368, 2003.

WILSON, M. E.; WEINSTOCK, J. V. Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. **Methods** 9: 248-254, 1996.

WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B. L.; MENTE K. A.; MCGOWAN S. E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, 161: 6148-6155, 1998.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, 38: 147-160, 2005.

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

WHO, 2002 Urbanization, an increase risk factor for leishmaniasis. *Weekly epidemiology record* 44: 365-372.