



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



LJM11, uma molécula presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis* com potencial de proteção contra a infecção no modelo de *L. braziliensis*.

Jurema de Melo e Cunha

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2015

123 Cunha, Jurema

LJM11, uma molécula presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis* com potencial de proteção contra a infecção no modelo de *L. braziliensis*. Jurema de Melo e Cunha – Salvador: J. Cunha, 2015.

IX, 100p.: il.

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração em Imunologia, apresentada à Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

1. Leishmaniose Cutânea; 2. *Leishmania braziliensis*; 3. Vacina; 4. Proteína Salivar. Título.

CDU:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



LJM11, uma molécula presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis* com potencial de proteção contra a infecção no modelo de *L. braziliensis*.

JUREMA DE MELO E CUNHA

Professor-orientador: Cláudia Ida Brodskyn

Co-orientadora: Clarissa Teixeira

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), ano 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Sara Timóteo Passos, (Presidente), Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFBA, e pesquisadora associada do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia.

- Patrícia Sampaio Tavares Veras, Professora permanente nos Programas de pós-graduação em Patologia Humana da UFBA e em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do CPqGM-FIOCRUZ-BA. Pesquisadora-titular do CPqGM/FIOCRUZ-BA.

- Anderson Sá Nunes, Professor Doutor do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e chefe do Laboratório de Imunologia Experimental.

Membros Suplentes:

- Cláudia Ida Brodskyn, Professora Orientadora, Professora Adjunta da UFBA e Pesquisadora Titular do CPqGM, FIOCRUZ/BA.

“E então chegou o dia em que o perigo de persistir sendo um botão causou mais sofrimento do que o risco de desabrochar.”

Anaïs Nin

DEDICATÓRIA

A meus filhos Marcela e Bruno, razões da minha existência, pela simplicidade de me ensinarem o verdadeiro significado da palavra amor.

A meu companheiro de vida, Marcelo Rubeiz Velame, por me apoiar sempre em cada nova caminhada.

A meus queridos pais, José Guilherme e Zenilde, pelo amor dedicado, e pelos exemplos de caráter, ética e dignidade.

A meus irmãos queridos: Moema, Murilo, Maurício, Mauro e Alcides, pela torcida.

À minha querida tia Marialva Souza, exemplo de força e integridade.

Às minhas amigas queridas, companheiras de caminhada, Cristianne Matos Cunha, Maria Nadir Gomes, Karina Abbehusen e Silvana Guimarães.

AGRADECIMENTOS:

- A Dra. Cláudia Ida Brodskyn por compartilhar comigo sua valiosa experiência, por me acolher no grupo e pela generosidade na orientação;
- A Dra. Clarissa Teixeira, pela enriquecedora orientação, excelente companhia e acolhimento;
- A Dr. Manoel Barral-Netto e Dra. Aldina Barral pela acolhida no laboratório e contribuições intelectuais;
- A Dr. Jesus Valenzuela pela valiosa contribuição;
- A Dra. Valéria Borges, Dra. Theolis Bessa, Dr. Jorge Clarêncio e Dra. Camila Indiani de Oliveira pelo apoio intelectual.
- A Melissa Abbehusen, amiga querida, pelo acolhimento, amizade e orientação;
- Aos amigos do LIMI/LIP: Martha Suarez, Natália Tavares, Laís Pereira, Claire Santos, Seilma dos Santos, Priscila Guerra, Juliana Almeida, Suzane Amorim, Diego Costa, Rômulo Santiago, Fabiana Celes, Rebecca Curvelo;
- A Elze Leite e Andrezza Soares pela amizade, acolhimento e competência;
- Ao apoio técnico de Natalí Alexandrino;
- À equipe do biotério pela colaboração com o fornecimento dos animais;
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA, LIMI – Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação;
- A Dra. Cristiana Nascimento pelo acolhimento e apoio;
- Aos colegas e professores do PPgCS;
- À valiosa contribuição de Ana Cibele, na secretaria do PPgCS;
- À fonte financiadora FAPESB.

Fontes de Financiamento:

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
2. Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, LIM1
– Laboratório de Imunorregulação

ÍNDICE

ÍNDICE DE SIGLAS

- APC – Células Apresentadoras de Antígeno
- CD4+ - Co-receptor de linfócito T auxiliar
- CD8+ - Co-receptor de linfócito T citolítico
- DTH – Resposta de Hipersensibilidade Tardia
- ELISA – Ensaio de Imuno-Absorção Ligado à Enzima
- IFN- γ – Interferon Gamma
- IgG – Imunoglobulina G
- IgG1 – Imunoglobulina G1
- IgG2a – Imunoglobulina G2a
- IL-4 – Interleucina-4
- IL-10 – Interleucina-10
- IL-12 – Interleucina-12
- LACK – Receptor para Cinase C Ativada Homóloga da *Leishmania*
- Lip0 – Proteína Ácida Ribossomal
- LVA – Leishmaniose Visceral
- LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
- LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
- LCM – Leishmaniose Cutânea Mucosa
- LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LCDi – Leishmaniose Cutânea Disseminada
- LJM11 – Proteína salivar do vetor *Lu. longipalpis*
- MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NK – “Natural Killer”

NO – Óxido Nítrico

PBS – Phosphate Buffer Saline (Salina Fosfatada)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RPMI – “Roswell Park Memorial Institute Medium”.

SBF – Soro Bovino Fetal

SGS – Sonicado de Glândula Salivar

Th1/Th2 – Células T Auxiliares 1 ou 2

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I: Análise da resposta imune humoral em soro de camundongos contra LJM11 (IgG total) através de ELISA	34
FIGURA II: Produção de anticorpos contra as subclasses IgG1 e IgG2a em soro de camundongos após imunização	35
FIGURA III: Aspecto histológico da Resposta de Hipersensibilidade Tardia - DTH na orelha	36
FIGURA IV: Avaliação da espessura da orelha dos camundongos para análise do DTH.....	37
FIGURA V: Porcentagem de células TCD4+ produtoras de IFN- γ em animais imunizados com LJM11 através de citometria de fluxo	38
FIGURA VI: Detecção de citocinas no sobrenadante das células esplênicas quinze dias após imunização com LJM11	39
FIGURA VII: Acompanhamento do desenvolvimento da lesão após infecção com <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de <i>Lu. longipalpis</i> ou <i>Lu. intermedia</i>	41
FIGURA VIII: Avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo após infecção por <i>L. braziliensis</i>	42
FIGURA IX: Produção de citocinas pelos linfonodos de camundongos BALB/c 48 h e duas semanas após infecção por <i>L. braziliensis</i> na presença de SGS de <i>Lu. longipalpis</i> ou <i>Lu. intermedia</i>	45
FIGURA X: Expressão de IFN- γ por células TCD4+ no linfonodo, 2 (A) e 5 (B) semanas após infecção com <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de <i>Lu. longipalpis</i> ou <i>Lu. intermedia</i>	48

SUMÁRIO

ÍNDICE DE SIGLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
I. RESUMO	14
I.1 ABSTRACT	15
II. INTRODUÇÃO	17
II.1. Leishmanioses	17
II.2. Leishmaniose Cutânea	18
II.3. Resposta imune em modelo murino	19
II.4. Vacinas para Leishmaniose Cutânea	21
II.5. Proteínas Salivares de Flebotomíneos	23
III. HIPÓTESE	26
IV. OBJETIVOS	26
IV.1. Objetivo Geral	26
IV.2. Objetivos Específicos	26
V. DESENHO EXPERIMENTAL 1	27
VI. DESENHO EXPERIMENTAL 2	28
VII. MATERIAL E MÉTODOS	29
VII.1. Animais	29
VII.2. Parasitas	29
VII.3. Preparo do Sonicado de Glândula Salivar (SGS) de <i>Lu. ...</i> <i>intermedia</i> e <i>Lu. longipalpis</i>	29
VII.4 . Imunização	30
VII.5. Determinação de IgG total, IgG1 e IgG2a por ELISA	30
VII.6. Infecção Intradérmica com <i>L. braziliensis</i>	31
VII.7. Carga Parasitária	31
VII.8. Detecção de Citocina Intracelular por Citometria de Fluxo .	31
VII.9. Detecção de Citocina em Sobrenadante de Células do Linfo- nodo e Baço Através de ELISA	32
VII.10. Análise Estatística	33
VIII. RESULTADOS GERAIS	34
VIII.1. Avaliação da resposta imune humoral em animais imunizados com LJM11	34
VIII.2. Análise histológica das orelhas para avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia	36
VIII.3. Expressão de IFN - γ após imunização	38
VIII.4. Detecção de citocinas após imunização	39

VIII.5.	Avaliação da infecção por <i>L. braziliensis</i>	40
VIII.6.	Avaliação da carga parasitária após infecção	42
VIII.7.	Produção de citocinas 48 horas e 2 semanas após infecção..	44
VIII.8.	Expressão de IFN- γ por células TCD4+ no linfonodo	47
IX.	DISCUSSÃO	50
X.	CONCLUSÃO	61
XI.	ANEXOS	66
	ANEXO 1: Protocolo 027/11 - Ofício do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	66
	ANEXO 2: Artigo: “Vaccination with <i>Leishmania infantum</i> Acidic Ribosomal P0 but Not Nucleosomal Histones Proteins Controls <i>Leishmania infantum</i> Infection in Hamsters”. Pereira L, Abbehusen M, Teixeira C, Cunha J, Nascimento IP, Fukutani K et al. 2015. PLoS Negl Trop Dis 10(2): e0003490. Dóí: 10.1371/journal.pntd 0003490.....	67

I. RESUMO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos. Diversos estudos têm demonstrado que a saliva de flebotomíneos, inoculada junto com o parasita no momento da transmissão, é composta por moléculas potencialmente imunomodulatórias que favorecem o estabelecimento da infecção. Apesar da gravidade dessa doença e da dificuldade na prevenção, ainda não existe vacina disponível para humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar se a estratégia de imunização com a proteína recombinante LJM11, presente na saliva do flebotomo *Lutzomyia longipalpis*, é capaz de proteger camundongos BALB/c em um modelo de infecção experimental utilizando *Leishmania braziliensis* associada com SGS (sonicado de glândula salivar) do vetor *Lutzomyia intermedia*, transmissor natural da *L. braziliensis*, ou associado com SGS de *Lu. longipalpis*, vetor transmissor da *Leishmania infantum*. Camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína LJM11 ou BSA (500 ng/animal) como grupo controle. Para avaliação da resposta imune pré-desafio, avaliamos a produção de anticorpos anti-LJM11 e a resposta imune celular no local da imunização. A imunização com a proteína LJM11 foi capaz de gerar uma resposta imune humoral com a indução da produção de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-LJM11 e uma resposta inflamatória após 48 horas no local do desafio. Uma maior frequência de células TCD4+ expressando IFN- γ , foi detectada no infiltrado inflamatório nas orelhas dos animais imunizados com LJM11 quando comparados aos controles. Na avaliação da resposta imune pós-imunização também detectamos a produção de IL-10 após re-estimulação com LJM11 das células esplênicas dos animais imunizados com BSA, o que não foi observado no grupo imunizado com a LJM11. Após a última imunização, os camundongos foram infectados e a carga parasitária avaliada 2, 5 e 10 semanas após o desafio e o desenvolvimento da lesão acompanhado semanalmente. A imunização com a LJM11 resultou em redução significativa da lesão e na carga parasitária no grupo de animais desafiados com *L. braziliensis* associado ao SGS de *Lu. longipalpis*. No grupo infectado com *L. braziliensis* associada com SGS de *Lu. intermedia*, a imunização com a LJM11 conferiu proteção inicialmente, porém, não foi capaz de controlar a lesão a partir da oitava semana, onde podemos identificar a persistência do parasito na lesão. Entretanto, também observamos um controle transitório da carga parasitária e no desenvolvimento da lesão nos animais imunizados com BSA e desafiados com *L. braziliensis* associado ao SGS de *Lu. longipalpis*, sugerindo que a infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva desta espécie de vetor favorece o estabelecimento inicial da infecção no hospedeiro. Na avaliação da resposta imune pós-desafio observamos inicialmente, após 48h, uma maior produção específica de IFN- γ por células do linfonodo somente dos animais imunizados com LJM11. Nos animais imunizados com BSA detectamos inicialmente a produção de IL-10 enquanto a produção de IFN- γ foi observada apenas duas semanas após a infecção. Na avaliação da expressão de IFN- γ por linfócitos TCD4+ observamos um aumento na frequência desta população de linfócitos nos grupos desafiados com *L. braziliensis* associado ao SGS de *Lu. longipalpis* comparado

aos animais desafiados com *L. braziliensis* associado ao SGS de *Lu. intermedia* duas semanas após o desafio. Estes resultados sugerem que a imunização com LJM11 resulta em uma resposta protetora, com uma redução significativa da carga parasitária e no controle no desenvolvimento da lesão causada na infecção por *L. braziliensis* realizada na presença da saliva de *Lu. longipalpis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, proteína salivar, vacina.

I.1. ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and are transmitted by different species of sandflies. Previous studies have shown that sand fly saliva, inoculated alongside *Leishmania* during transmission, is composed by immunomodulatory molecules that enhance parasite infection. Despite disease severity and difficulty in prevention, there is no vaccine available for humans. The objective of this study was to evaluate if the immunization strategy using the recombinant protein LJM11, present in the saliva of the *Lutzomyia longipalpis* sandfly, is able to protect BALB/c mice in an experimental model using *Leishmania braziliensis* associated with SGS (salivary gland sonicate) of *Lutzomyia intermedia*, the natural vector of *L. braziliensis*, or *L. braziliensis* associated with *Lu. longipalpis* SGS, vector of *Leishmania infantum*. BALB/c mice were immunized three times with LJM11 protein or BSA (500 ng/animal) as a control group. For evaluation of the pre-challenge immune response, we evaluated the production of anti-LJM11 antibodies and cellular immune response at the ear and expression of cytokines in the inflammatory infiltrate by flow cytometry. Immunization with LJM11 protein was able to generate a humoral immune response and induce IgG, IgG1 and IgG2a anti-LJM11 and an inflammatory response at the site after 48 hours following immunization with LJM11. A higher frequency of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ was detected in the inflammatory infiltrate of mice immunized with LJM11 when compared to controls. Production of IL-10 was also detected after stimulation with LJM11 of spleen cells from animals immunized with BSA, but not with LJM11. After the last immunization, mice were infected and the parasite loads evaluated 2, 5 and 10 weeks post-infection and lesion measurements were performed weekly. Immunization with LJM11 resulted in a significant reduction of lesion size and parasite load in the group challenged with *L. braziliensis* plus *Lu. longipalpis* SGS. In the group infected with *L. braziliensis* plus *Lu. intermedia* SGS, immunization with LJM11 conferred protection initially, that was no longer observed after week eight post-infection where we could identify the persistence of the parasite in the lesion. However, we also observed a transient reduction in the lesion and parasite load in the group immunized with BSA and challenged with *L. braziliensis* plus *Lu. longipalpis* SGS, suggesting that infection with *L. braziliensis* performed in the

presence of saliva from this species of sand fly benefits the initial establishment of the parasite in the host. In the post-challenge evaluation of the immune response, we observed that initially, after 48h, a higher specific production of IFN- γ by lymph node cells was only observed in the groups immunized with LJM11. In the groups immunized with BSA we detected an initial production of IL-10 while IFN- γ production was detected only two weeks after infection. In the evaluation of IFN- γ expression by TCD4+ lymphocytes by lymph node cells, we observed a higher frequency in the groups challenged with *L. braziliensis* in the presence of *Lu. longipalpis* SGS compared to groups challenged with *L. braziliensis* plus *Lu. intermedia* SGS two weeks after infection. These results suggest that immunization with LJM11 resulted in protection, with a significant reduction of parasite load and lesion development control, caused by *L. braziliensis* in the presence of *Lu. longipalpis* saliva.

Key words: *L. braziliensis*, salivary protein, vaccine

II. INTRODUÇÃO

II.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, que têm como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. Possuem ampla distribuição mundial, afetando 12 milhões de indivíduos, estando presentes em quase todos os continentes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas em 88 países sofrem o risco de contrair a infecção, com registro de dois milhões de novos casos ao ano (Kedzierski 2011).

Sendo um protozoário unicelular da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e de ciclo heteroxênico, a *Leishmania* é transmitida aos hospedeiros vertebrados por vetores flebotomíneos. O gênero *Leishmania* compreende mais de 30 espécies, sendo que aproximadamente 20 dessas causam infecções no homem (Ashford 2000).

Dependendo da espécie da *Leishmania* envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro, diferentes manifestações clínicas são observadas (revisto em de Moura et al. 2007). A infecção do hospedeiro invertebrado acontece quando a fêmea do flebótomo, pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) ao se alimentar em um hospedeiro mamífero infectado, ingere macrófagos parasitados por amastigotas da *Leishmania*. No interior do trato digestivo do inseto, os macrófagos se rompem e as formas amastigotas livres se transformam em formas flageladas promastigotas que migram e aderem ao epitélio da região anterior do intestino. Durante o repasto sanguíneo, ao picar hospedeiros mamíferos, o flebótomo infectado inocula formas promastigotas metacíclicas infectantes e diferentes produtos do vetor, incluindo a saliva. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos que se instalam no interior do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (Murray 2001; Murray et al. 2005).

As infecções por *Leishmania* apresentam dois tipos clássicos de manifestação clínica: tegumentar (cutânea, mucocutânea, disseminada e difusa) e visceral, sendo transmitidas pela picada de diferentes espécies de flebotomíneos. Cada manifestação

possui características peculiares: as formas tegumentares permanecem localizadas na pele ou superfícies mucosas, enquanto que a forma visceral é uma das formas mais graves, caracterizada por uma infecção generalizada que acomete o sistema retículo endotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo, podendo ser fatal se não tratada (Murray 2001).

II.2. LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta um espectro de manifestações clínicas como a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), a Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCDi) (Morais & Roselino 2014).

A *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* são as espécies predominantes no Brasil, e *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* estão presentes no Velho Mundo (Reithinger & Dujardin 2006). Interações complexas definem as manifestações clínicas para cada espécie, abrangendo desde as características infectivas até o estado imunológico do hospedeiro humano (Pearson & Sousa 1996). A cura clínica da leishmaniose não significa que o indivíduo eliminou completamente o parasito. Assim, a permanência desse protozoário mantém constante uma resposta específica ao parasita, dificultando a reinfecção (Coutinho et al. 2002).

A LCL no Novo Mundo, causada pela *Leishmania braziliensis* é caracterizada por sua cronicidade, latência e tendência a metastizar no hospedeiro humano (Kamhawi et al. 2000). Suas lesões se caracterizam pela formação de úlcera na pele em locais expostos à picada do vetor, como rosto, braços e pernas. Lesões cutâneas únicas ou múltiplas podem ocorrer, sendo mais frequente a úlcera indolor, de borda elevada e fundo necrótico e uma resposta inflamatória se desenvolve, sendo observado número reduzido ou ausente de parasitas. Primariamente, a LCL compromete a pele, mas a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento de lesões cutâneas (Bittencourt & Barral 1991). A leishmaniose muco-cutânea pode se desenvolver em 1 a 5% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* devido à capacidade do parasita em persistir dentro das cicatrizes após cura espontânea ou mediada por quimioterapia, e também pela capacidade da *L. braziliensis* em metastizar para a mucosa nasal

(Mendonça et al. 2004). Neste caso, uma destruição tecidual extensa é observada como resultado de uma resposta imune celular intensa, apesar do número restrito de parasitas presentes no local (Marsden PD 1986).

II.3. RESPOSTA IMUNE EM MODELO MURINO

A fagocitose desses protozoários na forma promastigota por macrófagos ou neutrófilos seguida pela liberação de enzimas hidrolíticas ou por intermediários reativos do oxigênio (ROS) são exemplos de mecanismos que são rapidamente ativados na tentativa de conter a infecção ainda nos momentos iniciais, além da produção de óxido nítrico (NO) (Bogdan et al. 1991). Além desses mecanismos iniciais, a produção de citocinas também é importante no recrutamento de outras células inflamatórias para o sítio da infecção (Belkaid, Mendez, et al. 2000). Estudos com amostras humanas através de análise histopatológica da lesão têm demonstrado a participação de neutrófilos em lesões recentes em infecção com *L. major* (Morgado et al. 2008) e com camundongos C57BL/6 por transmissão natural e por via intradérmica (Peters et al. 2009).

A resposta imune do hospedeiro pode influenciar no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da leishmaniose. O desenvolvimento da infecção dependerá dos estágios iniciais da infecção, que são essenciais na determinação de uma resposta entre as distintas subclasses de células T *helper* (Th) (Heinzel et al. 1989; Here et al. 1995). A resposta Th1 tem como característica a secreção de IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ e células natural killer (NK) (Reiner Steven & Locksley 1995). O TNF- α também está envolvido na indução da ativação de macrófagos em sinergismo com IFN- γ , que leva a ativação de mecanismos microbicidas do macrófago pela síntese de óxido nítrico (Murray et al. 1983; Liew et al. 1990), de radicais livres derivados do oxigênio e um aumento na concentração de enzimas lisossomais (Murray et al. 1991). Além disso, o IFN- γ ainda induz a ativação de células dendríticas e a secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, que induzem a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (Gumy et al. 2004). Entre as principais citocinas da resposta Th2 podemos destacar interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13), que inibem a produção de intermediários reativos de oxigênio em macrófagos ativados por IFN- γ (Bogdan et al. 2000). Células T CD4⁺ e células T NK podem

participar na produção de IL-4 nas primeiras horas de infecção, e com isso direcionar a diferenciação para Th2 (Noben-Trauth 2000).

O modelo de infecção subcutânea com *L. major* em camundongos vem sendo amplamente estudado, onde, inicialmente, altas doses de parasitas ($10^4 - 10^7$) eram inoculadas no sítio subcutâneo (base da cauda ou da pata) (Sacks & Noben-Trauth 2002). Foi estabelecido o paradigma Th1 ou Th2 neste modelo, onde camundongos BALB/c são espécies suscetíveis a essa infecção, desenvolvendo lesões progressivas com predominância de uma resposta Th2, caracterizada principalmente pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 (Kaye & Scott 2011). Esses animais desenvolvem lesões necróticas extensas, e que frequentemente os levam a óbito (Scott & Farrell 1982). Já espécies resistentes a essa infecção, como camundongos C57BL/6, apresentam poucos parasitas e uma pequena lesão, com predominância de outras citocinas relacionadas a uma resposta Th1, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-2. (Kaye & Scott 2011).

Determinados aspectos da biologia natural da transmissão por vetores são negligenciados neste modelo de infecção subcutânea, tais como a inoculação de baixas doses de parasitas, a presença da saliva do vetor e o sítio de inoculação. Um modelo de infecção intradérmico com inoculação de cerca de 100 a 1000 parasitas foi desenvolvido por Belkaid e colaboradores na presença da saliva do vetor, na derme da orelha de camundongos (Belkaid et al. 1998). Permaneceu o fenótipo de resistência e suscetibilidade, porém observou-se que houve a formação de lesões mais destrutivas e com maior número de parasitas com a inclusão da saliva do vetor.

A resposta imune na infecção por *L. braziliensis* tem sido mais explorada atualmente. A linhagem de camundongos BALB/c demonstra suscetibilidade, embora não desenvolva lesões tão graves que possam levar ao óbito, como ocorre nas infecções por *L. major* (Childs et al. 1984). A produção de IFN- γ foi similar na infecção de camundongos BALB/c com *L. major* ou com *L. braziliensis*, sendo que a produção de IL-4 foi menor em animais infectados com *L. braziliensis*. Talvez essa baixa produção de IL-4 esteja associada com uma maior resistência desses animais a essa infecção. Esses animais, quando tratados com anticorpos anti-IFN- γ , demonstraram incapacidade em controlar a infecção, indicando que um mecanismo dependente dessa citocina seja responsável pela morte da *L. braziliensis* em camundongos BALB/c (DeKrey et al. 1998).

Em um modelo de infecção intradérmica utilizando 10^5 parasitas de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, os animais foram capazes de curar a doença desenvolvendo uma resposta celular mista, Th1 e Th2, caracterizada pela produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10. Os parasitas persistiram no linfonodo de drenagem, mas foram eliminados do sítio de inoculação (Moura et al. 2005).

II.4. VACINAS PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A dificuldade no controle das leishmanioses determinada pela impossibilidade de controle biológico dos vetores por inseticidas, a toxicidade humana às drogas terapêuticas utilizadas e a duração do tratamento, torna o desenvolvimento de uma vacina, uma estratégia imprescindível no controle dessa doença. O fato de indivíduos desenvolverem imunidade protetora e de longa duração contra leishmaniose após a cura de lesões cutâneas demonstra que a possibilidade de uma vacina como medida preventiva contra essa doença é factível (Khamesipour et al. 2006). Sendo assim, a comunidade científica vem buscando alternativas no sentido de desenvolver e testar estratégias na obtenção de um candidato vacinal eficaz contra a leishmaniose (Brodszyn et al. 2003), quer sejam antígenos provenientes do parasito ou do vetor.

As vacinas para Leishmaniose são divididas em três categorias de acordo com o processo de produção: a) vacinas de primeira geração, onde são empregadas preparações antigênicas tipicamente constituídas por antígenos brutos; b) vacinas de segunda geração, que consistem de parasitos vivos geneticamente modificados, bactérias ou vírus recombinantes como vetores de expressão e antígenos recombinantes; c) vacinas de terceira geração, que incluem as vacinas de DNA (Palatnik-de-Sousa 2008). Existem vários trabalhos já publicados, nos quais podemos observar uma tendência na exploração dos candidatos vacinais de segunda e terceira gerações. Apesar da gravidade das leishmanioses, ainda não existem vacinas para humanos. Entretanto, as vacinas estão sendo consideradas como uma estratégia no controle dessa doença, que infelizmente tem sido dificultada pela significativa diversidade antigênica e pelo fato desses parasitos possuírem um ciclo biológico digenético (Handman 2001).

Até o momento, a leishmanização foi a única forma de vacinação realmente utilizada em humanos. Ela consiste na inoculação de parasitos mortos e de formas virulentas de *L. major*, extraídas de lesões ativas de pacientes (Khamesipour et al.

2006). Apesar de apresentar resultados satisfatórios, induzindo até a uma imunidade duradoura, a falta de padronização e controle de qualidade inadequados, efeitos adversos como disseminação de lesões, perda da infectividade da cepa após múltiplas culturas e reativação da doença em indivíduos imunossuprimidos, levaram esse tipo de vacinação a ser descartado (Montalban et al. 1989). Além desses atenuantes, o fato da leishmaniose cutânea transmitida por *L. braziliensis* poder se desenvolver em leishmaniose mucosa, torna esse tipo de vacinação sem qualquer possibilidade prática.

Na busca por um antígeno eficiente, diversos componentes de *Leishmania* foram purificados e testados como candidatos vacinais. A gp63, uma glicoproteína expressa na superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, foi a primeira proteína recombinante utilizada para essa finalidade (Handman 2001). Entretanto, ao ser testada como proteína recombinante, não conferiu proteção contra a infecção por *L. major* (Handman et al. 1990), e conferiu proteção parcial em macacos (Olobo et al. 1995). Já quando foi testada associada a adjuvantes, conferiu proteção completa contra *L. major* e *L. amazonensis* em camundongos (Rivier et al. 1999), (Russell & Alexander 1988). Outro antígeno testado, o LACK, que se expressa nos dois estágios do ciclo biológico do parasito, foi capaz de conferir proteção em camundongos BALB/c contra infecção por *L. major*, ao ser administrado conjuntamente com IL-12 (Mougueau et al. 1995).

A utilização de vírus ou bactérias recombinantes expressando antígenos de *Leishmania* é uma outra abordagem das vacinas de segunda geração, onde o microorganismo é utilizado como vetor de expressão e sistema adjuvante. O mecanismo de ação visa atrair células para o local da imunização e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (Lagranderie et al. 1996) e IL-12 (Flesch & Kaufmann 1995). Foi estudada em camundongos BALB/c, a imunização com *Toxoplasma gondii* ts-4 transgênico expressando a KMP-11 contra a infecção por *L. major*, conferindo proteção a esses animais (Ramírez et al. 2001).

Alguns antígenos de *Leishmania* têm sido administrados como vacinas de DNA, as quais têm demonstrado atividade protetora, tais como proteínas de membrana, ou algumas intracelulares, como as histonas nucleossomais, as proteínas de choque térmico e diferentes proteínas ribossomais (Dumonteil 2007; Khamesipour et al. 2006). Num estudo utilizando a proteína ácida ribossomal Lip0 administrada como vacina de DNA em camundongos BALB/c desafiados por *L. major*, foi observado que, apesar de ter conferido proteção a esses animais, não foi detectada a presença de anticorpos anti-

Lip0. Entretanto, observou-se um aumento na produção de IFN- γ nas células do linfonodo e nos esplenócitos (Iborra et al. 2003).

II.5. PROTEÍNAS SALIVARES DE FLEBOTOMÍNEOS

As interações entre os componentes da saliva de flebotomos e a resposta imune do hospedeiro vêm sendo amplamente demonstrados em estudos recentes. Pertencentes à classe Insecta, da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, esses flebotomíneos possuem cinco gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* que são encontrados no Velho Mundo ; *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (Lewis 1970). Ao se alimentarem, os flebotomíneos adultos preferem substâncias doces de origem vegetal, tais como seiva, néctar e frutas maduras. Além desse açúcar, porém, as fêmeas necessitam realizar a hematofagia para auxiliar no amadurecimento de seus ovos (Lewis 1970; Forattini et al. 1973). Durante o repasto sanguíneo, pequenos vasos são dilacerados causando uma pequena hemorragia, facilitando assim a alimentação. Primeiramente, a saliva do flebotomo ao ser inoculada auxilia na contenção dos mecanismos hemostáticos naturais do hospedeiro vertebrado (Forattini et al. 1973). O sucesso da alimentação desses flebotomíneos reside no fato da saliva possuir substâncias com capacidade hemostática tais como moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes e antiplaquetárias (Ribeiro et al. 2000).

Em um estudo realizado, utilizando como modelo de infecção a inoculação de *L. major* juntamente com a saliva de *Lu. longipalpis* ou *Phlebotomus papatasi*, observou-se a exacerbação da infecção, facilitando, assim, o estabelecimento do parasita no hospedeiro (Belkaid et al. 1998; Donnelly et al. 1998; Sérgio et al. 2001). Efeitos similares também foram observados utilizando modelo de infecção com *L. braziliensis* (Samuelson et al. 1991; Donnelly et al. 1998).

Tem-se observado, por outro lado, que a pré-exposição à saliva ou aos produtos da saliva, geram proteção ao menos parcial contra um desafio posterior constituído de parasita associado com a saliva. Esses resultados encorajam a busca por possíveis candidatos vacinais nos produtos da saliva.

O fato de possuir em sua constituição uma grande quantidade de proteínas, a saliva de flebotomíneos induz no hospedeiro vertebrado uma resposta imune celular ou humoral contra seus componentes. Essa resposta progride a partir de uma reação de

hipersensibilidade tardia (DTH), seguida por uma reação de hipersensibilidade imediata, finalizando com a ausência de reação do hospedeiro (Mellanby 1946). Tem-se demonstrado que humanos ou camundongos expostos à picadas de *P. papatasi* desenvolvem uma intensa reação inflamatória contra os antígenos salivares, havendo ainda produção de anticorpos anti-saliva. Após imunização, a picada do flebótomo ou a injeção do extrato de glândula salivar leva a um infiltrado de células inflamatórias no local, 24 a 48 horas após a administração das proteínas salivares. Esse tipo de resposta facilita a alimentação do flebótomo, aumentando o fluxo sanguíneo no local da reação (Belkaid, Valenzuela, et al. 2000). As funções e as propriedades antigênicas das composições salivares variam consideravelmente entre diferentes espécies de flebotomíneos (Warburg et al. 1994). O soro de animais expostos naturalmente a picadas de *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti* e *Lu. longipalpis* apresentaram anticorpos anti-saliva, embora estes reconheçam principalmente antígenos específicos à sua espécie. Além disso, quando imunizados com SGS de *Lu. longipalpis*, esses animais se tornaram menos suscetíveis contra a infecção por *L. amazonensis*, mas não com SGS das outras espécies (Thiakaki et al. 2005).

Maxadilan (7 kDa), o primeiro peptídeo isolado e caracterizado, presente na saliva do *Lu. longipalpis*, foi utilizado como estratégia de vacinação em camundongos CBA e foi capaz de gerar proteção contra um posterior desafio com *L. major* associado com saliva de *Lu. longipalpis* (Morris et al. 2001). Foram isoladas e caracterizadas algumas proteínas salivares do *P. papatasi*, vetor da *L. major* no Velho Mundo. Uma das proteínas, com peso molecular de 15 kDa foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 desafiados com *L. major* mais o SGS de *P. papatasi* (Oliveira et al. 2008). Uma vacina de cDNA que codifica essa proteína (SP15) também foi capaz de proteger camundongos desafiados com o parasita mais SGS (Valenzuela et al. 2001). Observou-se também que em camundongos deficientes de células B, essas duas vacinas foram capazes de controlar a infecção (Valenzuela et al. 2001), sugerindo assim que a resposta celular contra estas proteínas pode ser o principal responsável pela proteção observada. No modelo animal de leishmaniose visceral, LJM19, uma proteína da glândula salivar de *Lu. longipalpis*, protegeu hamsters contra a infecção por via intradérmica por *Leishmania infantum*, associada com SGS de *Lu. longipalpis* (Gomes et al. 2008). Foi testado em hamsters duas estratégias de vacinação utilizando-se plasmídios de DNA que codificam a proteína LJM19 ou SGS de *Lu. longipalpis*, com um desafio posterior contra *L. braziliensis* associada com SGS de *Lu. intermedia*,

resultando em proteção, com redução no tamanho da lesão e na carga parasitária (Tavares et al. 2011). Recentemente, foi demonstrado que a vacinação com o cDNA codificando a proteína LJM11 da glândula salivar de *Lu. longipalpis* induziu uma forte reação de hipersensibilidade tardia (DTH) e produção de IFN- γ em camundongos, e os protegeu contra o desafio constituído de *L. major* mais o sonicação da glândula salivar (SGS) de *Lu. longipalpis* (Xu et al. 2011). Além disso, foram isoladas e testadas algumas proteínas salivares do vetor *Lu. intermedia*, e a estratégia de imunização utilizando DNA plasmidial codificando a proteína Linb-11 resultou em proteção em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis*, com redução da carga parasitária e aumento na frequência de células produtoras de IFN- γ (de Moura et al. 2013).

LJM11 é uma proteína presente na glândula salivar de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, similar às proteínas “yellow” presentes em *Drosophila melanogaster* e às proteínas presentes na geleia real produzidas por abelhas (Xu et al. 2011). A capacidade desta molécula em induzir uma reação imune em vertebrados e/ou posteriormente protegê-los contra *Leishmania* tem sido demonstrado em estudos recentes (Xu et al. 2011; Gomes et al. 2008). Hamsters imunizados com vacinas de DNA, codificando a proteína LJM11 foram capazes de controlar a infecção por *Leishmania infantum* por um período de dois meses após o desafio com o parasita. Esta proteção parcial em hamsters foi associada a uma forte reação de hipersensibilidade tardia (DTH) no local do desafio com a presença, principalmente, de macrófagos e linfócitos no infiltrado celular (Gomes et al. 2008). Humanos e cães que habitam em uma área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil com a presença do vetor *Lu. longipalpis*, produzem anticorpos específicos contra LJM11 demonstrando a sua imunogenicidade e potencial como marcador de exposição a picadas do vetor (Andrade & Teixeira 2012). LJM11 possui algumas características que a qualificam como um bom candidato a componente em vacinas contra *Leishmania*: 1) é uma proteína fortemente imunogênica entre diferentes espécies de hospedeiros e parece induzir preferencialmente uma resposta imune celular do tipo 1 (Th1), que é protetora contra o parasita; 2) não possui nenhuma homologia com proteínas de mamíferos; 3) apesar de ser originada da saliva do vetor *Lu. longipalpis* foi capaz de proteger contra a forma cutânea após o desafio com *L. major*, evidenciando a sua capacidade protetora contra outras espécies do parasita e 4) pode ser produzida em grande quantidade como proteína recombinante (Xu et al. 2011).

III.HIPÓTESE

A imunização com a proteína recombinante LJM11 é capaz de gerar proteção contra a LCL em camundongos BALB/c, reduzindo a carga parasitária e o tamanho da lesão, causadas por *L. braziliensis*, em um modelo experimental de infecção.

IV.OBJETIVOS

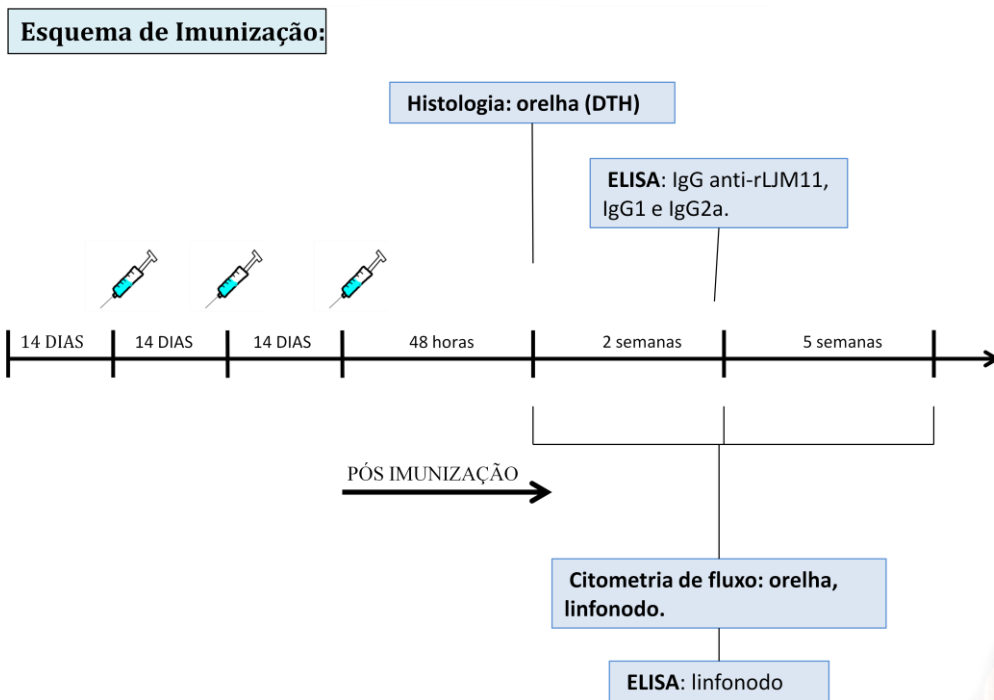
IV.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade protetora da imunização com a proteína LJM11 em camundongos BALB/c desafiados com *Leishmania braziliensis* mais SGS de *Lutzomyia intermedia* ou *Lutzomyia longipalpis*.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar as respostas imunes humoral e celular, induzidas pela imunização com a proteína salivar recombinante LJM11 em camundongos BALB/c;
- ✓ Avaliar a capacidade protetora induzida pela imunização com LJM11 frente à infecção por *L. braziliensis* associada com SGS (Sonicado de Glândula Salivar) de *Lutzomyia intermedia* ou *Lutzomyia longipalpis* em camundongos imunizados com a proteína LJM11 através da medida da lesão e da carga parasitária;
- ✓ Avaliar as respostas imunes induzidas após imunização com LJM11 e infecção por *L. braziliensis* associada com SGS de *Lutzomyia intermedia* ou *Lutzomyia longipalpis* em camundongos BALB/c.

V. DESENHO EXPERIMENTAL 1

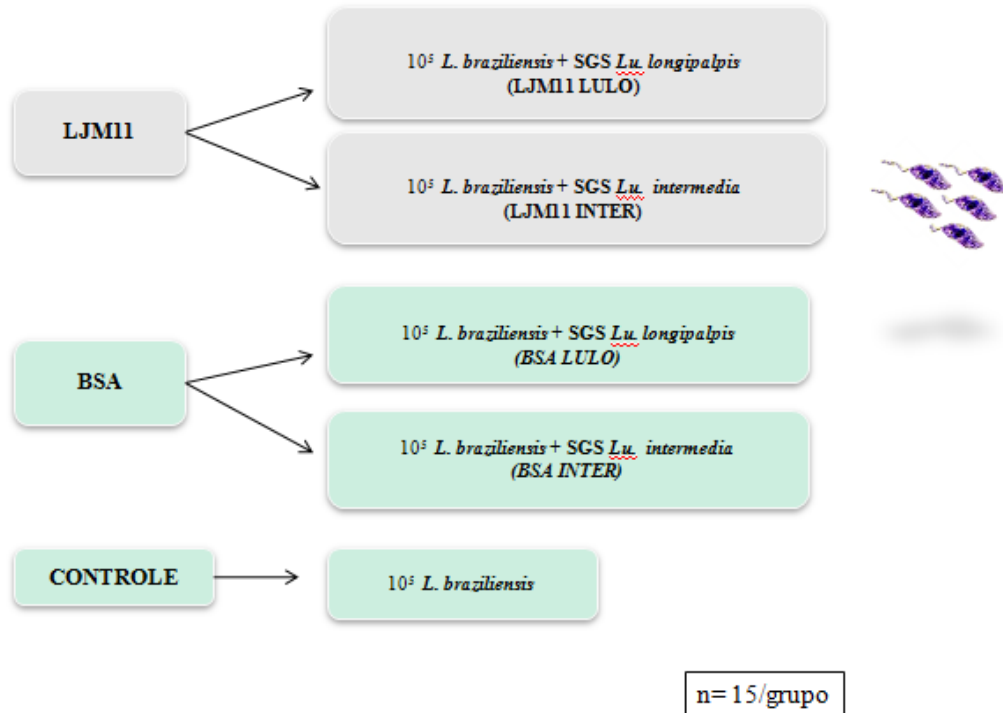


- **Animais:** camundongos BALB/c (15 por grupo);
- **Imunização:** rLJM11 (500ng/animal); BSA (500ng/animal)

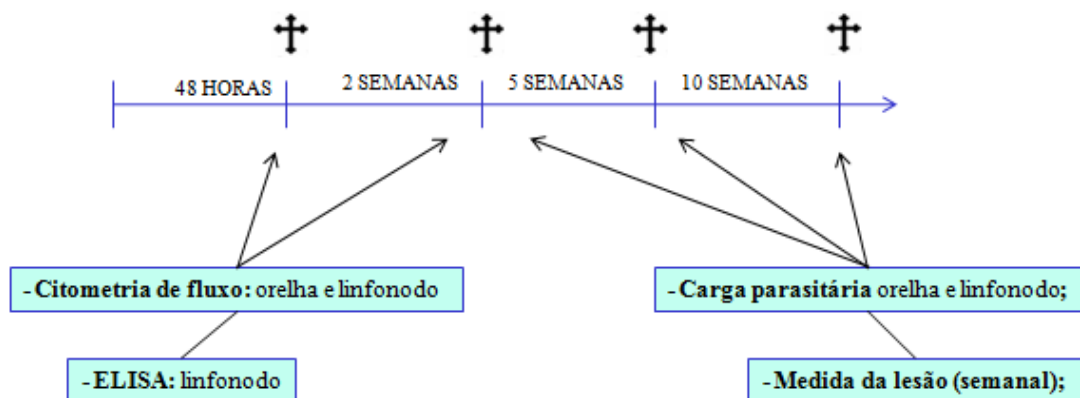


VI. DESENHO EXPERIMENTAL 2

GRUPOS:



PÓS-INFEÇÃO:



VII. MATERIAL E MÉTODOS

VII.1. Animais

Camundongos BALB/c, fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ) e foram mantidos em condições livres de patógenos. Todos os procedimentos de experimentação com os animais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqGM – Fiocruz (Licença 027-11).

VII.2. Parasitas

Parasitas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/788) em sua forma promastigota foram cultivados em meio Schneider (Sigma, EUA), suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10%, L-glutamina a 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL.

VII.3. Preparo do Sonicado de Glândula Salivar (SGS) de *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia longipalpis*

Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia intermedia*, cepa Corte de Pedra, foram coletados diretamente na área endêmica, separadas as fêmeas e retiradas as glândulas, e da espécie *Lutzomyia longipalpis*, cepa Cavunge, foram mantidas no Insetário do Laboratório de Imunoparasitologia/CPqGM, como descrito anteriormente (Titus & Ribeiro 1988). As glândulas salivares foram retiradas dos flebotomíneos de 5-7 dias após eclosão das larvas. Após dissecação, as glândulas foram estocadas em grupos de 20 pares em 20 µL NaCL (150mM) em tampão HEPES Buffer (10mM, pH 7,4), a -70° C até o momento do uso. Antes de serem utilizadas, as glândulas foram sonicadas por 40 segundos a frequência de 1 Hertz e potência de 90 Watts (Branson Sonifier, Danbury, CT, USA). Em seguida as glândulas foram centrifugadas a 10.000 RPM por 4 minutos

com o objetivo de separar as proteínas da saliva dos tecidos (carcaça) da glândula e o sobrenadante (SGS) resultante foi coletado para ser utilizado nos experimentos.

VII.4. Imunização

Os camundongos foram imunizados por via intradérmica na orelha direita com a proteína recombinante LJM11, que nos foi fornecida pelo nosso colaborador do NIH, Dr. Jesus Valenzuela. Grupos de camundongos foram imunizados 3 vezes, com intervalos de 14 dias, com 500ng da proteína, e os controles foram injetados com a mesma quantidade de BSA (albumina bovina sérica). Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

VII.5. Determinação de IgG total, IgG1 e IgG2a por ELISA

Foram coletados quinze dias após a última imunização, soro dos camundongos BALB/c imunizados via intradérmica três vezes em intervalos de 14 dias com 500 ng de BSA ou LJM11 na orelha direita, para determinação da presença de anticorpos anti-LJM11. Para realização do ELISA, placas Maxisorp (Nunc, EUA) de 96 placas foram sensibilizadas com 2µg/mL de LJM11 em solução de 0,1M Na₂HCO₃ e incubadas durante a noite, a 4°C. Após lavar a placa três vezes com PBS Tween 0,05% (250 µL/poço), bloqueia com PBS-BSA a 4% por duas horas a 37°C. Após lavar 3 vezes com PBS Tween 0,05%, acrescentamos 100 µL de soro (1:50) e incubamos por 1 hora a 37°C. Lavamos 3 vezes com PBS Tween 0,05% e incubamos com anticorpo secundário IgG, IgG1 ou IgG2a anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina (1:1000), e incubamos por 1 hora a 37°C. Após lavar 5 vezes, a placa foi incubada com 100 µL/poço de tampão carbonato bicarbonato + MgCL com o substrato pNPP (Sigma). A reação colorimétrica foi interrompida após adição de 50 µL/poço de NaOH 3M. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 405 nm e analisado pelo software Soft Max. Os resultados foram expressos em densidade ótica (OD).

VII.6. Infecção intradérmica com *L. braziliensis*

Duas semanas após a última imunização com a proteína LJM11, os camundongos foram desafiados por via intradérmica com agulha de 30G na orelha esquerda com 10 µL de 10⁵ promastigostas na fase estacionária (de 6 a 7 dias de cultura) na presença de:

- a) *L. braziliensis* mais o equivalente a 1 par de glândula de *Lu. intermedia*;
- b) *L. braziliensis* mais o equivalente a 0,5 par de glândula de *Lu. longipalpis*.

A diferença utilizada na quantidade das glândulas de acordo com cada espécie é justificada para garantir a correspondência aproximada na concentração das proteínas presentes na composição das glândulas salivares (Bradford 1976). Os animais controles que foram imunizados com BSA, receberam o mesmo desafio descrito em a e b. Além desses grupos controles, ainda tivemos um grupo controle desafiado apenas com o parasita. A espessura da orelha infectada foi monitorada semanalmente por meio de um paquímetro digital (Thomas Scientific). Os animais foram sacrificados 2, 5 e 10 semanas após a infecção para análise da carga parasitária.

VII.7. Carga parasitária

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, e foram retirados a orelha e o linfonodo drenante, sendo homogeneizados em 1 mL de meio Schneider (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Cripion), L-glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL. A carga parasitária foi quantificada por meio do ensaio de diluição limitante (Titus & Ribeiro 1988) e analisada pelo programa ELIDA (LIMA et al., 1997) .

VII.8. Detecção de citocina intracelular por citometria de fluxo:

Os anticorpos utilizados para identificação de linfócitos T e expressão de citocinas intracelulares por citometria foram obtidos da BD Biosciences (San Diego, USA) ou Ebioscience. Brevemente, as células do linfonodo ou células da orelha foram obtidas de camundongos BALB/c após imunização (48h) e em alguns experimentos

após a infecção (2 e 5 semanas). Os linfonodos drenantes da infecção foram macerados para obtenção de “pool” de células por grupo. Para obtenção das células da orelha inicialmente as orelhas foram incubadas com Liberase TL (Sigma) diluída em RPMI incompleto por uma hora a 37°C. Após a incubação, as orelhas foram maceradas e lavadas com RPMI incompleto. As células do linfonodo e/ou da orelha foram então distribuídas em placa de 96 poços (5×10^6 /ml) em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e 100 U/ml de penicilina e 100U/ml de estreptomicina. As células foram incubadas na ausência ou na presença de anti-CD3 e anti-CD28 (Ebioscience), rLJM11 (10 µg/ml) ou promastigotas de *L. braziliensis* (1:5) nas primeiras doze horas e posteriormente incubadas com Brefeldina A (10 µg/ml) nas últimas quatro horas a 37°C, 5% de CO₂. Após um total de 16h de cultura as células foram coletadas e transferidas para tubos onde foi realizada a marcação. Inicialmente foi realizado o bloqueio com anticorpo anti-Fc (BD, Fc Block CD16/CD32, 2.4G2) por 30 minutos a 4°C. Após o bloqueio, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS 1x + soro bovino fetal 1%) e incubadas com os anticorpos de superfície anti-CD4 PerCP-Cy5.5 e TCR-b FITC diluídos em tampão de FACS por uma hora a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas novamente utilizando o tampão de FACS. Para a marcação intracelular das citocinas, as células foram permeabilizadas com Cytofix/Cytosperm (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C e incubadas com anticorpos anti-citocinas conjugadas com diferentes fluorocromos. Utilizamos os seguintes anticorpos: anti-IFN-γ PE (XMG 1.2), anti-IL-10 APC (11B11) diluídos em tampão Perm/Wash 1x (BD Biosciences). Um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos usando FACSAria e os dados foram analisados com o software Flow Jo.

VII.9. Detecção de citocina em sobrenadante de células do linfonodo e baço através de ELISA

Os linfonodos drenantes da lesão e/ou baço foram obtidos após eutanásia dos camundongos, e macerados para obtenção de “pool” de células por grupo e plaqueados em placa de 96 poços (1×10^6 /ml) em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e 100 U/ml de penicilina e 100U/ml de estreptomicina. As células foram reestimuladas ou não com promastigotas de *L. braziliensis* (1:5) ou, em alguns experimentos, LJM11 (20 µg/ml) por 72h para coleta de sobrenadante. A

dosagem de citocinas no sobrenadante (IFN- γ , IL-10 ou IL-4) foi determinada por ELISA de acordo com protocolo dos kits da BD Bioscience, específico para cada citocina dosada.

VII.9. Análise Estatística:

Os resultados foram analisados pelo teste de Mann Whitney na comparação de 2 grupos e por Kruskal-Wallis com post-test de Dunn no caso de comparação entre múltiplos grupos de experimentação. Para a avaliação da lesão no camundongo, a espessura da orelha do camundongo imunizado e desafiado com o parasita mais a saliva de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia* foi anotada semanalmente, para cada camundongo individualmente. O curso da doença para os camundongos experimentais e controles foi individualmente avaliado e a área sob a curva de cada curva resultante foi calculado usando o software Prism (Graph Pad). Os valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

VIII. RESULTADOS GERAIS

VIII.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM ANIMAIS IMUNIZADOS COM LJM11

Para avaliação da resposta imune humoral induzida pela imunização com LJM11 foi realizado o teste de ELISA para detecção de IgG anti-LJM11, e as subclasses IgG1 e IgG2a, no soro de camundongos quinze dias após a terceira e última imunização. Podemos observar que os camundongos imunizados apresentaram uma produção significativa de anticorpos IgG total anti-LJM11 quando comparado aos controles imunizados com BSA. Este resultado demonstra o desenvolvimento de uma resposta imune humoral nos animais imunizados com LJM11. Podemos observar, ainda, que os animais imunizados com LJM11 apresentaram uma produção significativa das subclasses IgG1 e IgG2a anti-LJM11, não apresentando diferença na razão entre as duas subclasses de anticorpos.

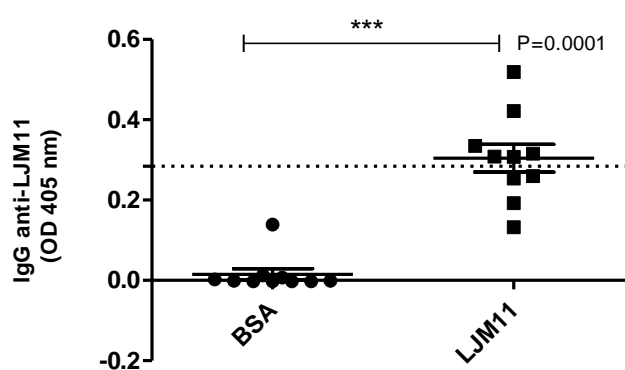


Figura I: Análise da resposta imune humoral em soro de camundongos contra LJM11 (IgG total) através de ELISA: Camundongos BALB/c foram imunizados por via intradérmica na orelha direita em três doses, em intervalos de quatorze dias, com 500 ng da proteína LJM11 ou BSA. Quinze dias após a última imunização, o soro

desses animais foi coletado e realizou-se o teste de ELISA para detecção dos anticorpos da classe IgG anti-LJM11. (n= 10 em cada grupo). ***p <0,001 (teste t não-paramétrico Mann Whitney)

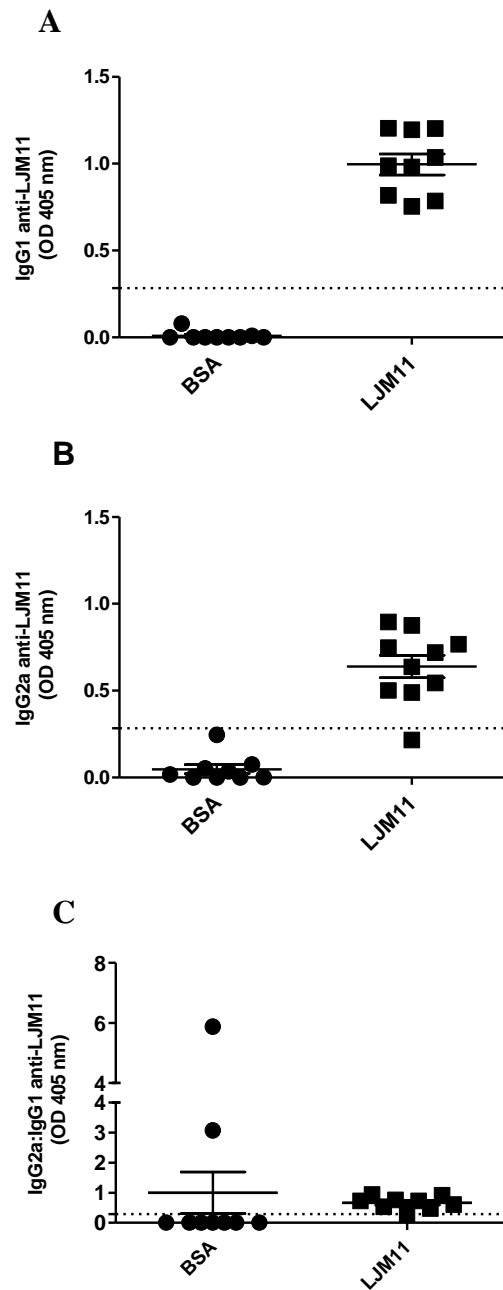


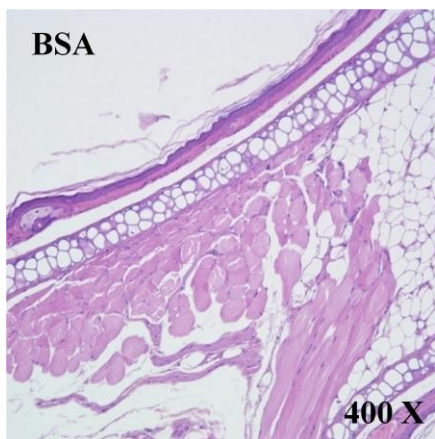
Figura II: Produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a em soro de camundongos após imunização: Os camundongos foram imunizados por via intradérmica na orelha direita em três doses, em intervalos de quatorze dias, com 500 ng da proteína LJM11 ou BSA. Quinze dias após a última imunização, o soro desses animais foi coletado e realizou-se o teste de ELISA para detecção dos anticorpos das

subclasses IgG1 (A) $***p < 0,003$, e IgG2a (B) $***p < 0,004$. Razão IgG2a:IgG1 (C) (n= 10 em cada grupo). (teste t não-paramétrico Mann Whitney)

VIII.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS ORELHAS PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA:

Para avaliar a capacidade da imunização com a proteína LJM11 em gerar uma resposta imune celular, 48 horas após a última imunização com a proteína LJM11 ou BSA, foi inicialmente realizada a medida da espessura da orelha e os animais foram em seguida eutanasiados, para remoção das orelhas, sendo submetidas à análise histopatológica. Como mostrado na figura 2, foi observado um intenso infiltrado inflamatório com a predominância de células mononucleares no local da imunização apenas nos animais imunizados com LJM11.

A) BSA



B) LJM11

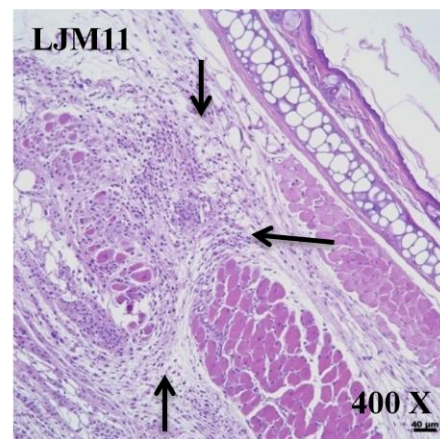


Figura III: Aspecto histológico da Resposta de Hipersensibilidade Tardia - DTH na orelha. Camundongos BALB/c foram imunizados três vezes em intervalos de 14 dias por via intradérmica na orelha direita utilizando a proteína BSA (A) ou LJM11 (B). As orelhas foram removidas 48 horas após a última imunização e coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica, aumentado em 400x para análise do aspecto histológico da resposta inflamatória. Fotos representativas de 3

animais por grupo, experimento repetido três vezes. Setas indicam infiltrado inflamatório.

Como podemos observar na figura abaixo, o grupo imunizado com a proteína LJM11, apresentou um aumento estatisticamente significativo na espessura da orelha no local da imunização, em relação ao grupo imunizado com BSA.

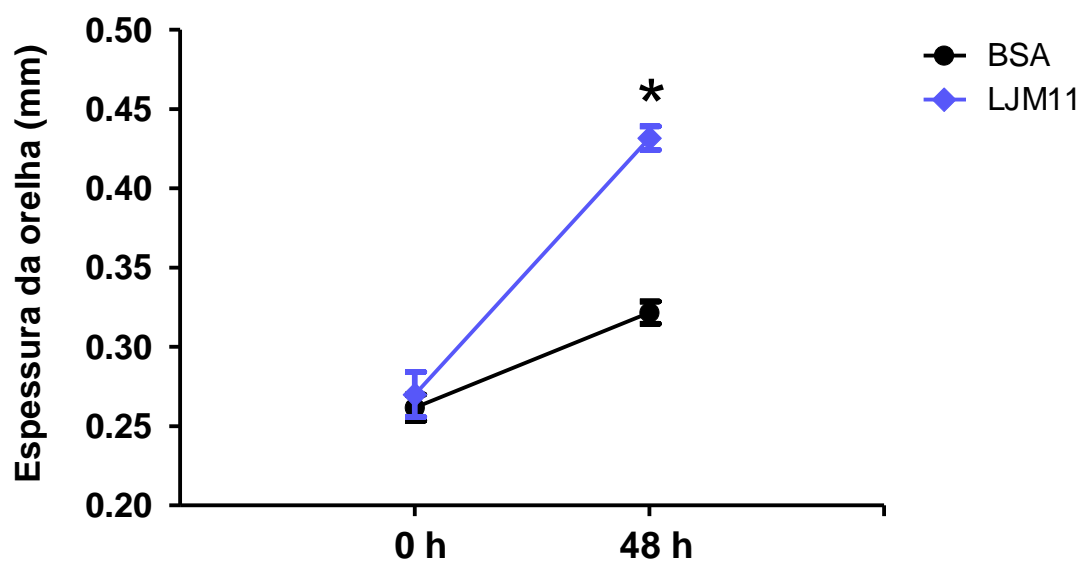


Figura IV: Avaliação da espessura da orelha dos camundongos para análise do DTH: Os animais foram imunizados por via intradérmica na orelha direita em três doses, em intervalos de quatorze dias, com 500 ng da proteína LJM11 ou BSA. Quarenta e oito horas após a última imunização, as orelhas foram mensuradas com paquímetro digital. (n= 10 em cada grupo) **p = 0,0049. (teste t não-paramétrico Mann Whitney)

VIII.3. EXPRESSÃO DE IFN- γ APÓS IMUNIZAÇÃO

Para avaliar o perfil do infiltrado inflamatório induzido com a imunização com a proteína LJM11, quarenta e oito horas após a última imunização, as orelhas foram coletadas e suas células foram estimuladas com a proteína LJM11 para avaliação da presença de linfócitos TCD4⁺ e expressão de IFN- γ por citometria de fluxo. Podemos observar na figura 5 que houve um maior percentual de linfócitos TCD4⁺ expressando IFN- γ no grupo de animais imunizados com LJM11, em comparação aos grupos controles.

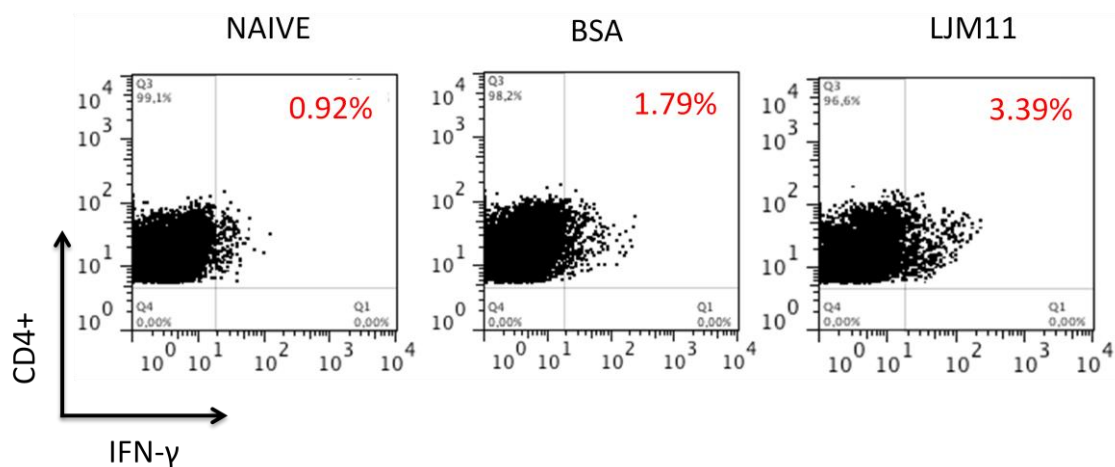


Figura V: Porcentagem de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ em animais imunizados com LJM11 através de citometria de fluxo: Camundongos foram imunizados por via intradérmica na orelha direita em três doses, em intervalos de quatorze dias, com 500 ng da proteína LJM11 ou BSA. Após 48 horas da última imunização, os animais foram submetidos à eutanásia, as orelhas imunizadas foram removidas e as células foram estimuladas com a proteína LJM11. Doze horas após estimulação as células foram coletadas e marcadas com TCR- β , CD4⁺ e IFN- γ para determinar a expressão de IFN- γ pela população de linfócitos TCR- β +CD4⁺ e

analizadas através de citometria de fluxo. Camundongos BALB/c não imunizados foram utilizados como controle. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=3 animais por grupo).

VIII.4. DETECÇÃO DE CITOCINAS APÓS IMUNIZAÇÃO

Duas semanas após a última imunização, os animais foram eutanasiados e os linfonodos drenantes do local da imunização e os baços foram retirados. As células foram estimuladas com a proteína LJM11 (10 µg/mL), e os sobrenadantes foram coletados e analisados para detecção das citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ através do teste ELISA. Não foi detectada produção de nenhuma dessas citocinas mencionadas no linfonodo. Porém, na cultura de células esplênicas, detectamos a produção de IL-10 no grupo imunizado com BSA e controle quando estimulamos com a LJM11, o que não foi observado no grupo imunizado com LJM11. As presenças de IFN-γ e IL-4 também não foram detectadas no sobrenadante da cultura das células esplênicas dos dois grupos.

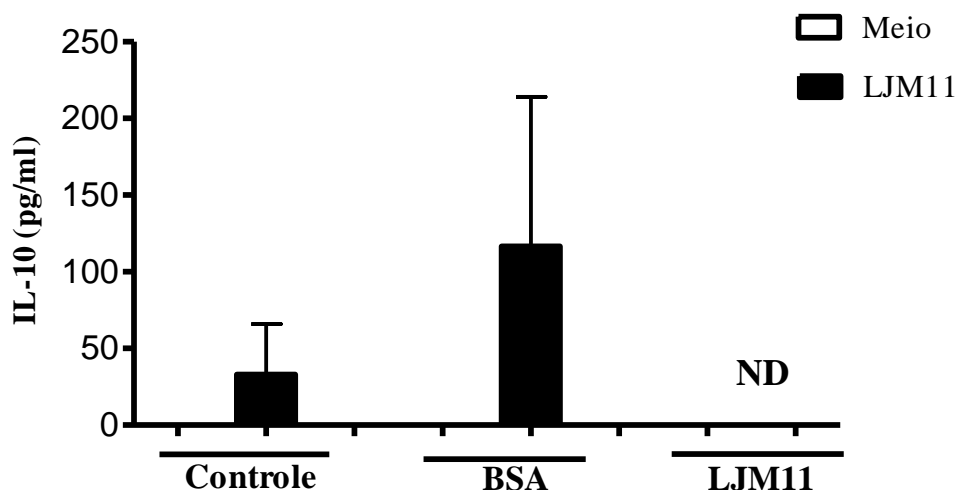


Figura VI: Detecção de citocinas no sobrenadante das células esplênicas quinze dias após imunização com LJM11: Camundongos foram imunizados por via intradérmica na orelha direita em três doses, em intervalos de quatorze dias, com 500 ng da proteína LJM11 ou BSA. Duas semanas após a última imunização, os animais foram eutanasiados e os baços foram retirados. As células foram estimuladas com a proteína LJM11 (10 µg/mL) e os sobrenadantes foram coletados após 72h e analisados por ELISA, para detecção da citocina IL-10. (n= 3 por grupo).

VIII.5. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. braziliensis*

Após realizar infecção dos camundongos com *L. braziliensis*, mensuramos as orelhas semanalmente para avaliar a progressão da lesão em cada grupo analisado. Observamos que no grupo imunizado com LJM11 e infectado com *L. braziliensis* associado à saliva de *Lu. longipalpis* (LJM11/Lbrazil+Lulo) houve uma redução significativa da lesão, fato este que podemos confirmar ao analisar o gráfico da Área Sob a Curva. O grupo imunizado com LJM11 e desafiado com *L. braziliensis* associado à saliva de *Lu.intermedia* (LJM11/Lbrazil+Linter) conferiu proteção inicialmente, porém, não foi capaz de controlar a lesão a partir da oitava semana. Curiosamente, o grupo imunizado com BSA e desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* (BSA/Lbrazil+Lulo) apresentou uma queda substancial na medida da lesão após a quinta semana, sugerindo um controle no desenvolvimento da lesão. Também observamos uma redução significativa na área sob a curva deste mesmo grupo. A mesma redução não foi observada no grupo imunizado com BSA e desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia* (BSA/Lbrazil+Linter) .

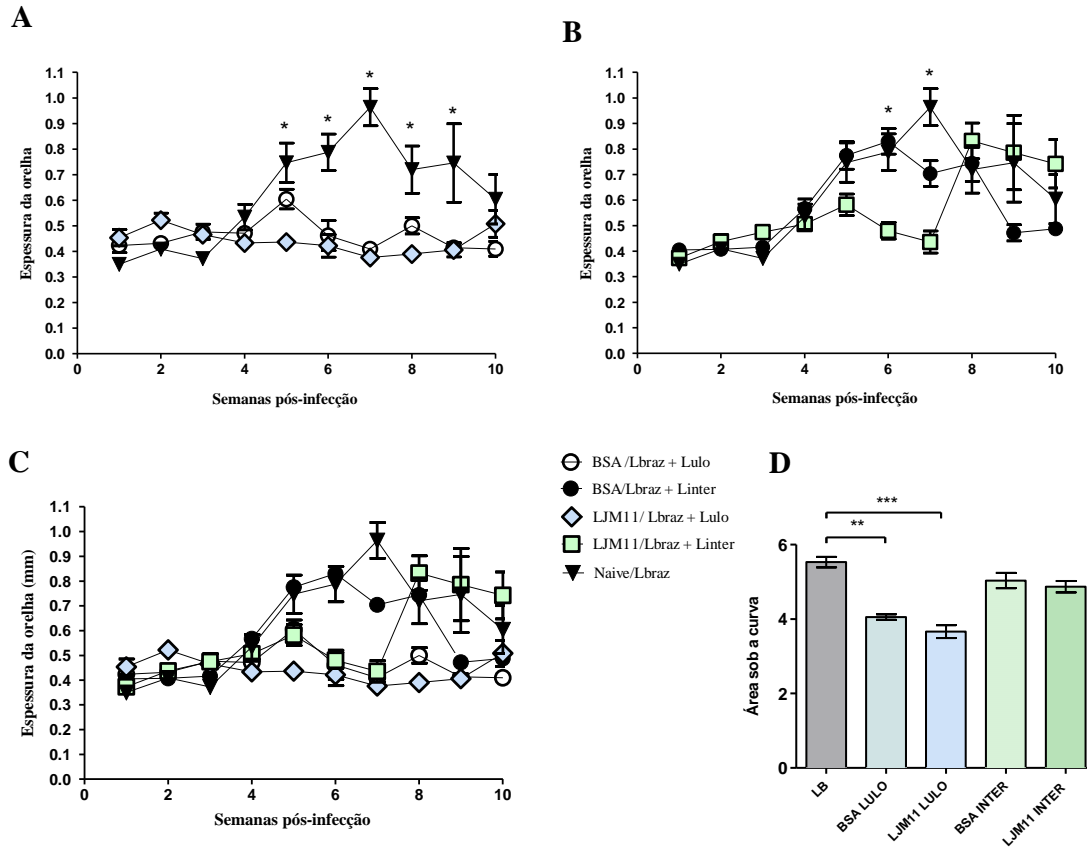


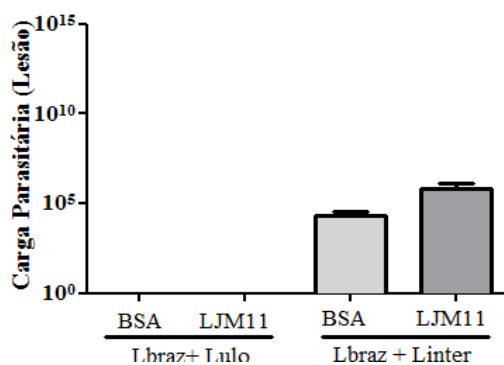
Figura VII: Acompanhamento do desenvolvimento da lesão após infecção com *L. braziliensis* na presença da saliva de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia*. Duas semanas após a terceira imunização com LJM11 ou BSA na orelha direita, realizamos infecção intradérmica com 10^5 promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* na presença de glândula salivar (SGS) de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia* na orelha esquerda e acompanhamos o desenvolvimento da lesão utilizando o paquímetro digital. Em (A) comparamos apenas os grupos desafiados com *L. braziliensis* associada com o SGS do *Lu. Longipalpis*, em (B) analisamos os grupos desafiados apenas com *L. braziliensis* associada com o SGS de *Lu. intermedia*., e em (C) comparamos todos os grupos. Em (D) apresentamos análise da Área Sob a Curva. (n= 15/grupo) (teste 1 way ANOVA)

VIII.6. AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA APÓS INFECÇÃO

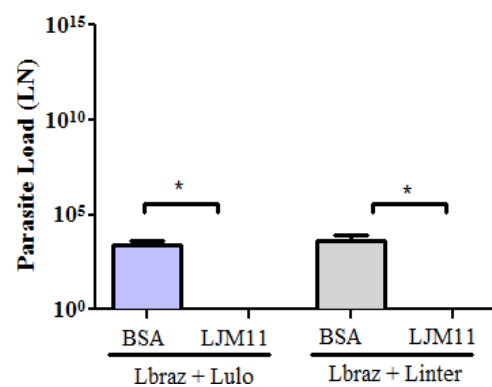
Para avaliar o potencial da imunização com a LJM11 em controlar a infecção causada por *L. braziliensis*, avaliamos também a carga parasitária duas, cinco e dez semanas após o desafio. Podemos observar que o grupo imunizado com LJM11 e desafiado com *L. braziliensis* associado ao SGS de *Lu. longipalpis* apresentou redução na carga parasitária na orelha e no linfonodo 2, 5 e 10 semanas após o desafio. Porém, no grupo imunizado com a LJM11 e desafiado com *L. braziliensis* na presença da saliva do *Lu. intermedia* foi observada uma redução significativa transitória no número de parasitas no linfonodo somente após duas semanas. Não houve redução significativa na carga parasitária nos grupos imunizados com BSA e desafiado com *L. braziliensis* + SGS *Lu. longipalpis* ou *L. braziliensis* + SGS *Lu. intermedia* nos pontos de avaliação pós-infecção.

2 Semanas:

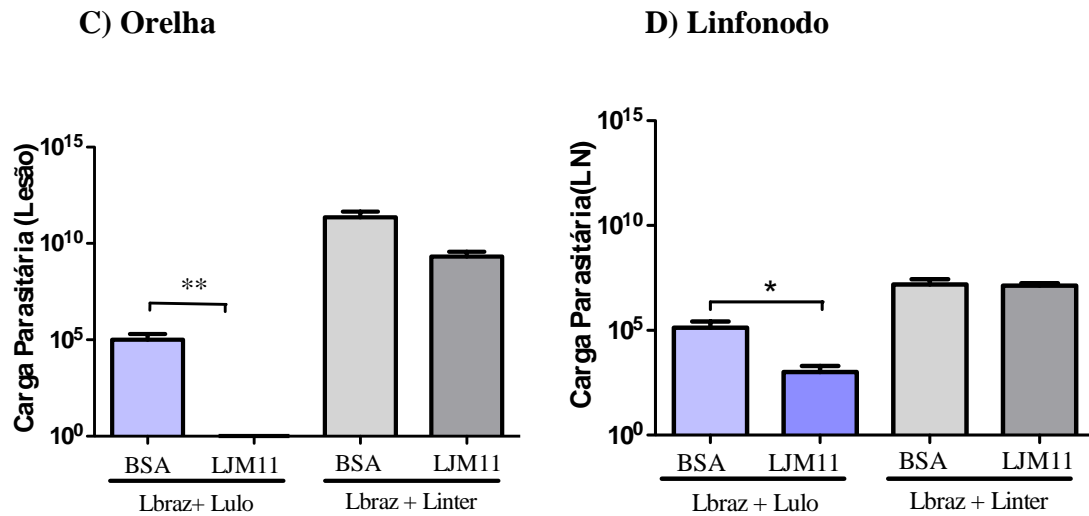
A) Orelha



B) Linfonodo



5 Semanas



10 Semanas

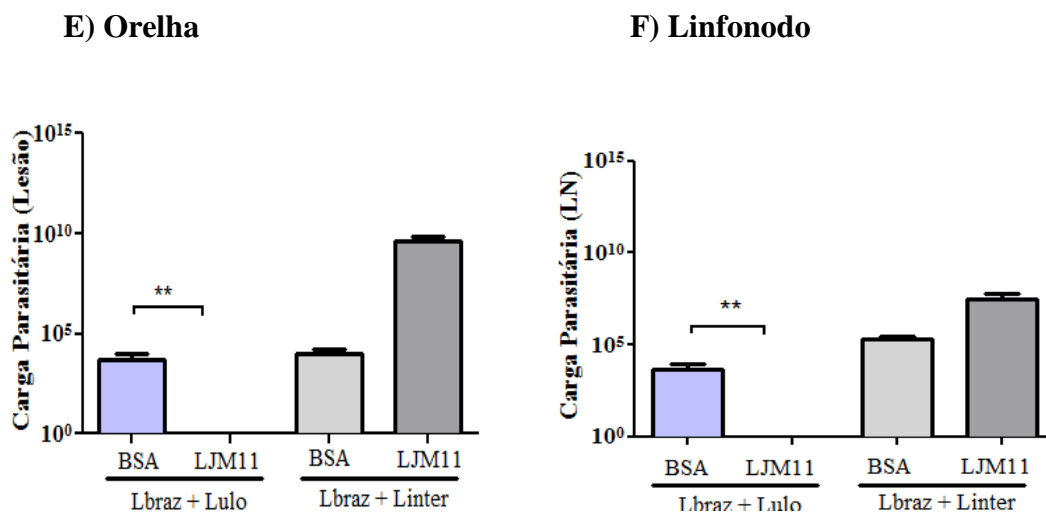


Figura VIII: Avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo após infecção por *L. braziliensis*. Camundongos imunizados por via intradérmica na orelha direita três vezes com intervalos de 14 dias com LJM11 ou BSA, foram desafiados após 15 dias com 10⁵ promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis* na presença de SGS de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia*. A carga parasitária na orelha (A, C e E) e linfonodo (B, D e F) foi avaliada nos períodos de 2, 5 e 10 semanas após a infecção por diluição limitante. *p < 0,0385, ** p < 0,05 (teste 1 way ANOVA).

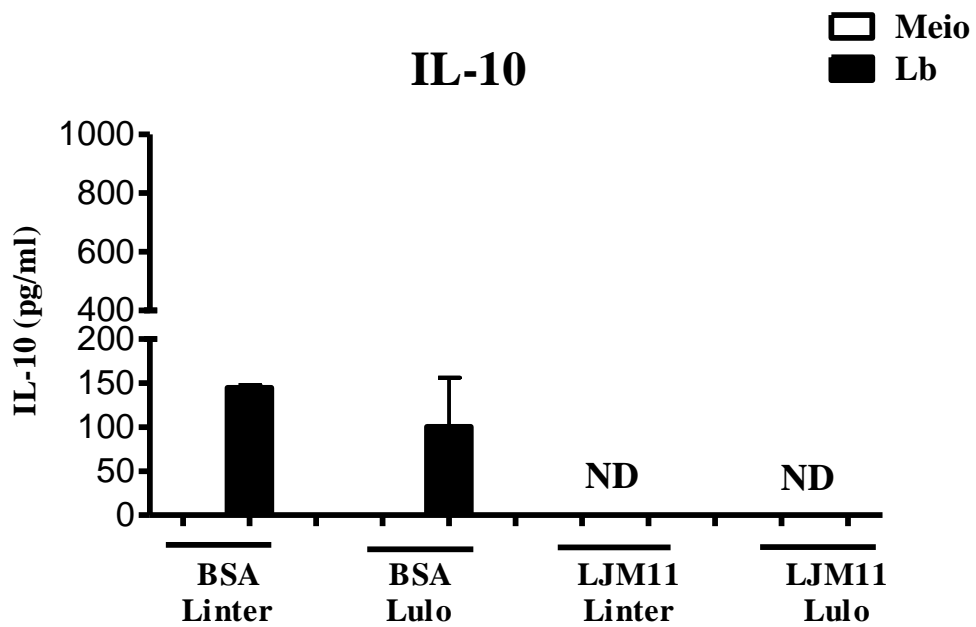
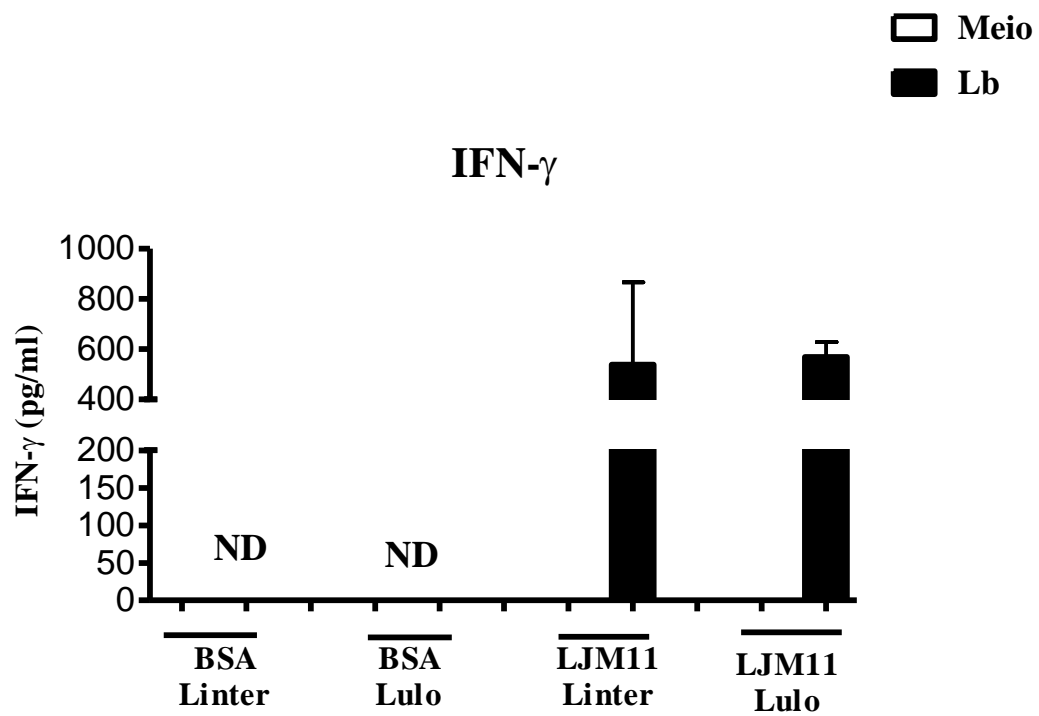
VIII.7. PRODUÇÃO DE CITOCINAS 48 HORAS E 2 SEMANAS APÓS INFECÇÃO

Com o objetivo de avaliar a resposta imune dos animais imunizados com LJM11 ou BSA após a infecção realizamos cultura das células do linfonodo drenante da lesão em um tempo inicial (48h) e mais avançado (2 semanas) pós-infecção.

Podemos observar que, 48h após a infecção, houve maior produção de IFN- γ pelos grupos imunizados com LJM11 nas duas estratégias de infecção em resposta a estimulação com *L. braziliensis*, em comparação com os grupos imunizados com BSA. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos desafiados com *L. braziliensis* associada com SGS de *Lu. longipalpis* (LJM11/Lulo) ou *Lu. intermedia* (LJM11/Linter). Quanto a produção de IL-10, podemos observar que houve uma maior produção de IL-10 após estimulação com *L. braziliensis* nos grupos imunizados com BSA nas duas estratégias de infecção, o que não foi observado nos grupos imunizados com LJM11. Porém, apenas os grupos imunizados com LJM11 apresentaram produção de IL-10 após estimulação com a LJM11 48 horas após o desafio. Não foi detectada produção de IL-4 em nenhuma das condições.

Duas semanas após a infecção, detectamos a produção de IFN- γ após estimulação com *L. braziliensis*, somente nos grupos imunizados com BSA. Não foi detectada produção de IL-10 e IL-4 no sobrenadante em nenhum dos grupos neste período pós-infecção.

(A) 48H



(B) 2 SEMANAS

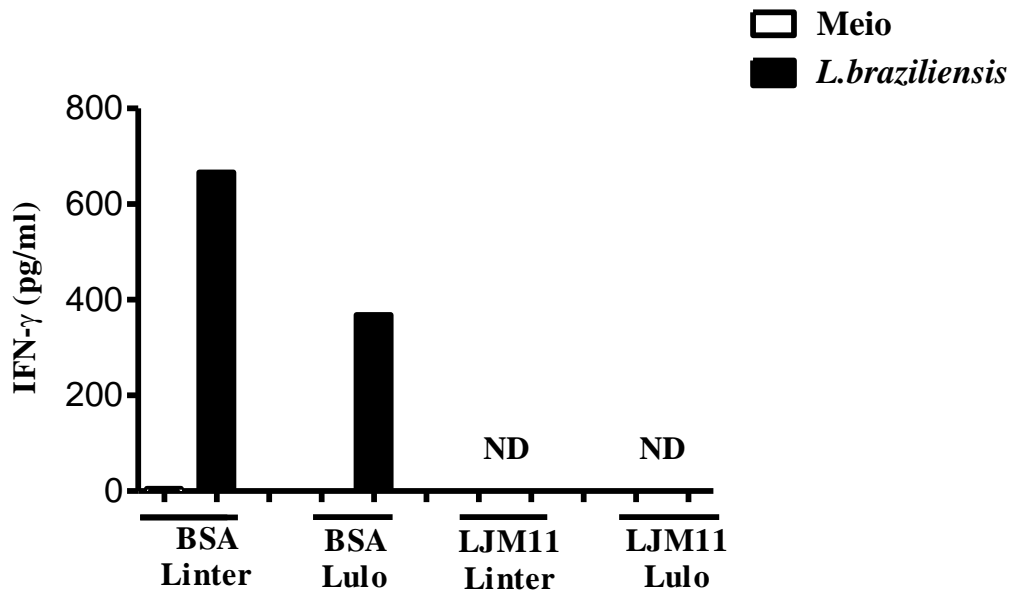


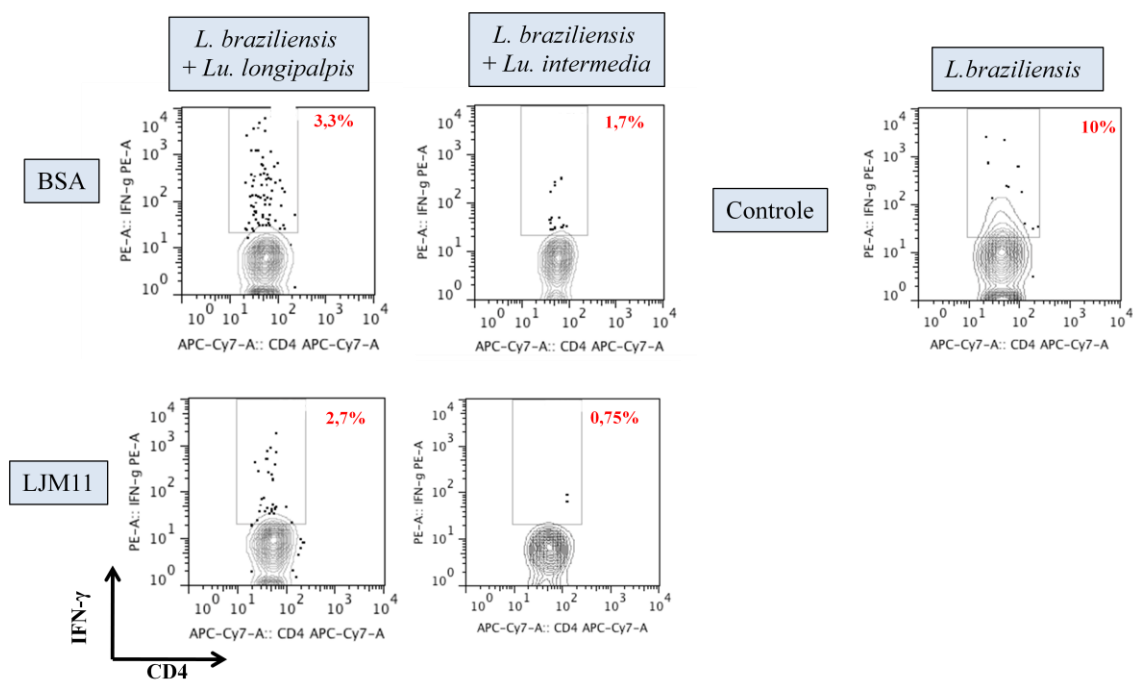
Figura IX: Produção de citocinas pelos linfonodos de camundongos BALB/c 48h e duas semanas após infecção por *L. braziliensis* na presença de SGS de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia*: Camundongos imunizados por via intradérmica na orelha direita três vezes com intervalos de 14 dias com LJM11 ou BSA, foram desafiados após 15 dias com 10^5 promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis* na presença de SGS de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia* na orelha esquerda. Quarenta e oito horas (A) e duas semanas (B) após o desafio, os camundongos foram eutanasiados e os linfonodos foram coletados. As células do linfonodo foram cultivadas sem estímulo (Meio) ou reestimuladas na presença de *L. braziliensis* (1:5, Lb), LJM11 (20 $\mu\text{g/ml}$) por 72 horas para análise da produção de citocinas. (n= 3 em cada grupo), ND = não detectado.

VIII.8. EXPRESSÃO DE IFN- γ POR CÉLULAS TCD4+ NO LINFONODO

Dando continuidade à avaliação da resposta imune celular nos linfonodos drenantes da lesão, também avaliamos a expressão de IFN- γ através de citometria de fluxo duas e cinco semanas após a infecção.

Podemos observar uma maior expressão de células TCD4+IFN- γ + nos grupos imunizados com BSA e LJM11 e desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* (3,3% e 2,7%, respectivamente) em comparação quando o desafio foi realizado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia* (1,7% e 0,75%, respectivamente). Entretanto, no grupo controle desafiado apenas com *L. braziliensis*, houve maior frequência de células TCD4+ produtoras de IFN- γ (10%), evidenciando uma resposta imune celular mais intensa no curso da infecção, quando os animais são infectados somente com o parasito. Cinco semanas após infecção, observamos uma redução na porcentagem de células TCD4+ produtoras de IFN- γ em todos os grupos, sendo que no grupo imunizado com LJM11 e desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* apresentou porcentagem similar ao grupo controle desafiado apenas com o parasito.

A) 2 SEMANAS



B) 5 SEMANAS

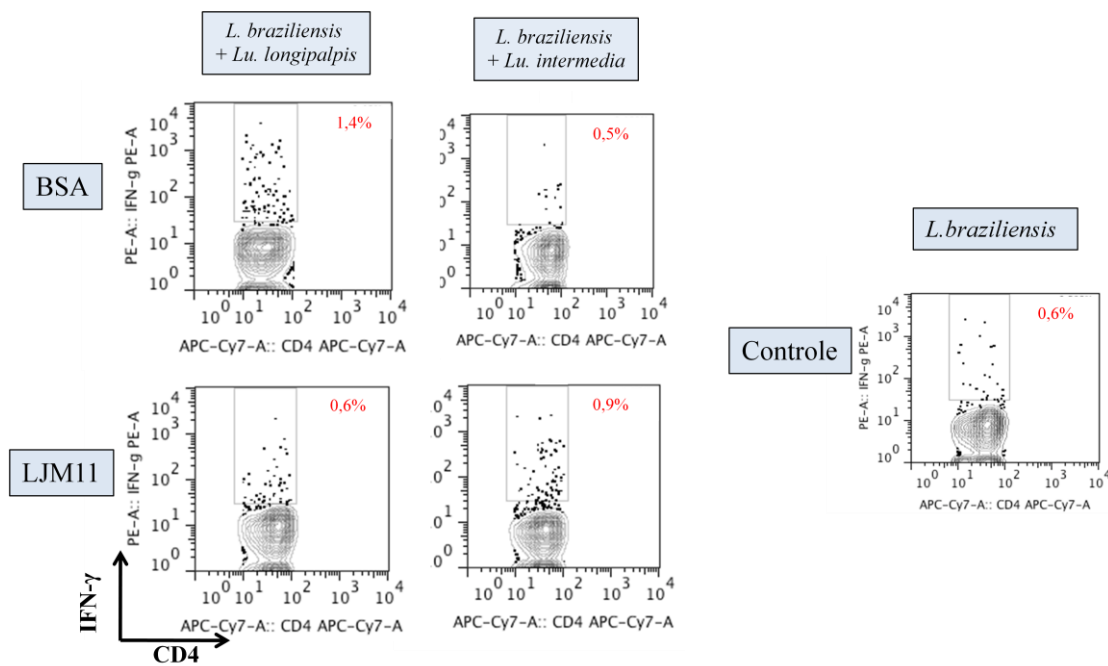


Figura X: Expressão de IFN- γ por células TCD4+ no linfonodo, 2 (A) e 5 (B) semanas após infecção com *L. braziliensis* na presença da saliva de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia*. Após imunização com LJM11 ou BSA em três doses e em intervalos de 14 dias, grupos de camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *Lu. longipalpis* ou *Lu. intermedia* foram eutanasiados após duas e cinco semanas e os linfonodos drenantes foram coletados para reestimulação *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28. Doze horas após estimulação as células foram coletadas e marcadas com TCR- β , CD4+ e IFN- γ para determinar a expressão de IFN- γ na população de linfócitos TCR- β +CD4+. Camundongos BALB/c não imunizados e infectados com *L. braziliensis* foram utilizados como controle (n= 3 por grupo). Dados representativos de dois experimentos independentes.

IX. DISCUSSÃO

Estudos com diversos modelos experimentais demonstrando a eficácia de moléculas salivares de flebotomíneos no desenvolvimento de uma resposta imune contra *Leishmania* nos encorajam a testar proteínas da saliva do vetor como potencial candidato a vacina contra essa doença (Tavares et al. 2011; Gomes et al. 2012; Gomes et al. 2008; Morris et al. 2001). A introdução da saliva no inóculo dos parasitos em modelos experimentais, além de mimetizar a infecção natural, levando a uma exacerbação na infecção, tem revelado um papel importante na relação parasito-hospedeiro, principalmente no estabelecimento da infecção. A pré-exposição à inoculação da saliva ou a picadas do vetor não-infectado é capaz de controlar o efeito exacerbador da infecção na presença da saliva ou mesmo pelas picadas do vetor infectado (B. Y. Belkaid et al., 1998; Kamhawi, 2000), nos levando a considerar a importância de estudar a capacidade protetora de proteínas salivares. Estudos recentes têm demonstrado que a proteína LJM11, encontrada na saliva do *Lu. longipalpis*, é fortemente imunogênica e capaz de conferir proteção contra a infecção por *L. major* no modelo murino e *L. braziliensis* no modelo do hamster (Xu et al. 2011; Gomes et al. 2012; Tavares et al. 2011).

Apesar da LJM11 ser uma proteína presente na glândula salivar do *Lu. longipalpis*, vetor responsável pela transmissão da *L. infantum*, foi demonstrado recentemente que a imunização de hamsters com vacinas de DNA codificando a proteína salivar de *Lu. longipalpis*, conhecida como LJM19, foi capaz de proteger os animais contra uma infecção constituída de *L. braziliensis* mais saliva de *Lu. intermedia* ou *Lu. longipalpis* (Tavares et al. 2011). A ideia de testar a proteína LJM11 nesse trabalho utilizando glândulas salivares de vetores diferentes durante o desafio, o *Lu. intermedia* sendo o vetor transmissor natural da *L. braziliensis*, e o *Lu. longipalpis*, vetor onde é encontrada a proteína LJM11, surgiu da observação desses estudos realizados, que geraram um questionamento a cerca da proteção conferida por essas moléculas, se sua eficácia pode ser comprovada diante de qualquer espécie de *Leishmania*.

Neste trabalho utilizamos como modelo experimental a linhagem de camundongos BALB/c que, embora não desenvolvam lesões tão graves que possam

levar ao óbito, como ocorre nas infecções por *L. major* (Childs et al. 1984), representam de forma mais próxima ao desenvolvimento da infecção e aspecto clínico da lesão que é observado também no homem na infecção por *L. braziliensis* (Moura et al. 2005).

Inicialmente avaliamos a resposta imune humoral após imunização onde observamos uma produção significativa de anticorpos IgG total anti-LJM11 nos animais imunizados com LJM11, embora, conforme já citado anteriormente, estudos demonstrem que a resposta imune eficaz contra leishmaniose cutânea em murinos é independente da resposta imune humoral, estando relacionada diretamente com uma resposta imune celular eficiente (Gomes et al. 2012). Sendo assim, resolvemos avaliar a produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a, onde foi observado que houve uma produção significativa nos animais imunizados com LJM11, das duas subclasses quando comparado aos animais imunizados com BSA. No trabalho realizado por Gomes e colaboradores, a imunização de camundongos C57BL/6 com LJM11 resultou em uma produção específica de IgG2a e não de IgG1 anti-LJM11 (Gomes et al. 2012). No modelo murino, a produção específica de IgG2a tem sido relacionado com uma resposta Th1 e a produção de IFN- γ , enquanto que a produção de IgG1 é relacionado a uma resposta Th2 (Oliveira et al., 2006, Agallou, 2011). Entretanto, estudos anteriores demonstraram que camundongos BALB/c apresentam uma dominância de anticorpos da subclasse IgG1 e não de IgG2a, o que poderia explicar o perfil da produção das subclasses diferente da que foi encontrado em camundongos C57BL/6 (Ebrahimpoor et al. 2013; Lestinova et al. 2015).

Já vem sendo demonstrado que o controle da infecção pela *Leishmania*, e que leva à eliminação do parasito, tem a participação efetiva de células mononucleares, como macrófagos e linfócitos, por produzirem radicais reativos de oxigênio após ativação (Murray et al. 1983; Liew et al. 1990). Com relação à saliva do vetor, estudos pioneiros demonstraram que após a pré-sensibilização e posterior desafio com *L. major*, uma forte reação de DTH foi observada, caracterizado pela predominância de células mononucleares. Este intenso infiltrado inflamatório pôde ser visualizado após 18 horas do desafio, e apresentava maior intensidade com 48 horas (Belkaid et al., 1998). Esta forte correlação entre a produção de uma resposta celular específica com a presença de uma reação de DTH no local do desafio com a presença de um infiltrado celular composto por linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ já foi demonstrado em diversos

modelos de pré-exposição a saliva de flebotomíneos, incluindo *P. papatasi*, *P. duboscqi* e *Lu. intermedia* (Belkaid, Valenzuela, et al. 2000; Teixeira et al. 2014; Weinkopff et al. 2014). Nossos resultados foram similares, demonstrando que a imunização com a proteína LJM11 leva a formação de um intenso infiltrado inflamatório no local do desafio com predominância de células mononucleares, o que não foi observado no grupo imunizado com BSA. Ao mensurar as orelhas de camundongos BALB/c antes e após 48 horas da imunização, pudemos comprovar o aumento significativo da espessura da orelha, em consonância com um trabalho realizado com camundongos C57BL/6, onde foi avaliado o DTH produzido após imunização com LJM11 (Gomes et al. 2012). Belkaid e colaboradores sugerem que o DTH, além de favorecer o repasto sanguíneo dos flebotomíneos e facilitar a infecção, é um mecanismo subjacente à proteção contra *Leishmania* (Belkaid, Valenzuela, et al. 2000). Estudos realizados com hamsters imunizados com vacina de DNA que codifica LJM19, uma proteína da saliva do *Lu. longipalpis*, demonstraram resultados semelhantes, com o desenvolvimento de DTH com infiltrado de células mononucleares (Tavares et al. 2011), (Gomes et al. 2008). O fato de termos encontrado uma maior expressão de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺ na composição do infiltrado inflamatório da orelha no grupo vacinado com LJM11 48 horas após a última imunização demonstra que essa proteína induz um padrão de resposta celular Th1 localizado, importante no controle da infecção.

Com o objetivo de caracterizar a resposta imune induzida pela LJM11, também reestimulamos as células dos linfonodos e baço com LJM11 duas semanas após a última imunização. Surpreendentemente, não foi detectada a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10, nos linfonodos dos dois grupos que foram imunizados com BSA e LJM11. Entretanto, foi detectada a produção de IL-10 no baço dos animais imunizados apenas com BSA em resposta a reestimulação com a LJM11 o que não foi observado no grupo imunizado com a LJM11. Estes resultados pós-imunização também diferem com os resultados obtidos em C57BL/6 onde foi detectada a produção de IFN- γ na resposta imune pós-imunização, em linfonodos e esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com LJM11, e observou-se ainda baixa produção de IL-10 pelas mesmas células e produção de IL-4 apenas nas células do baço (Gomes et al. 2012), demonstrando a indução de uma resposta imune mista Th1/Th2. Entretanto, houve diferença na técnica utilizada por Gomes e colaboradores em relação ao nosso ensaio, onde foi realizado um protocolo de enriquecimento dos linfócitos T, com a utilização de células dendríticas diferenciadas a

partir de células de medula óssea de camundongos C57BL/6 previamente pulsadas com LJM11 e utilizadas para estimular os linfócitos dos camundongos imunizados com a LJM11 (Gomes et al. 2012).

Ao avaliarmos a capacidade protetora após imunização com a proteína LJM11, constatamos que houve um controle no desenvolvimento da lesão no grupo imunizado com LJM11 e desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis*, com redução significativa da carga parasitária na orelha e linfonodo. Entretanto, no grupo imunizado com LJM11 e desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*, observamos um controle inicial da lesão até a oitava semana pós-infecção. Neste mesmo grupo observamos uma redução inicial da carga parasitária duas semanas após infecção no linfonodo que não foi controlada após 5 semanas, onde podemos identificar a persistência do parasito na lesão e um aumento na quantidade de parasitas no linfonodo drenante. A persistência do parasita no linfonodo drenante mesmo após a cura clínica já foi descrito anteriormente na infecção por *L. braziliensis* (de Moura et al. 2007). Estudos em pacientes demonstraram resultados semelhantes, onde a persistência do parasito foi comprovada através de PCR em amostras humanas (Ramírez & Guevara 1997). Estes resultados sugerem que essa persistência em sítios específicos do sistema imune do hospedeiro pode indicar benefício para ambos, já que o antígeno sempre presente estimularia o sistema imune do hospedeiro resultando no desenvolvimento de memória imunológica, impedindo uma reinfecção. Em contrapartida, o hospedeiro serviria de reservatório para o parasito, garantindo sua transmissão (Ramírez & Guevara 1997).

Nos grupos imunizados com BSA, enquanto não observamos proteção no grupo desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*, uma redução significativa no tamanho da lesão foi observada no grupo desafiado com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis*. Porém, apenas uma diminuição transitória na carga parasitária foi observada após duas semanas, sugerindo uma proteção parcial. Este achado difere dos dados na literatura que demonstram um efeito exacerbador da saliva de *Lu. longipalpis* na infecção. Estudos anteriores demonstraram exacerbação da infecção após co-inoculação da saliva de *Lu. longipalpis* com *L. major* (Theodos et al. 1991). Resultado semelhante foi observado na infecção por *L. amazonensis* na presença da saliva da mesma espécie do vetor resultando no agravamento da lesão e modulação na expressão de IL-10 no local da infecção (Norsworthy et al. 2004). Entretanto, a infecção de

hamsters com *L. chagasi* na presença da saliva de *Lu. longipalpis* não resultou em aumento na carga parasitária ou dos aspectos clínico-patológicos da infecção (Gomes et al. 2008). Nossos resultados sugerem que a presença da saliva de *Lu. longipalpis* no momento da infecção com a *L. braziliensis* pode, de alguma forma, alterar a resposta imune do hospedeiro resultando em um atraso no estabelecimento da infecção. Na avaliação da resposta imune pós-infecção, observamos que os grupos desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* (imunizados com LJM11 ou BSA) apresentaram uma produção aumentada de IFN- γ similar ao observado após re-estimulação de células do linfonodo com *L. braziliensis* 48h após o desafio. O mesmo foi observado com relação à frequência de células TCD4+IFN- γ + no linfonodo duas semanas após o desafio (3,3% no grupo BSA e 2,7% no grupo LJM11). Uma possibilidade é que essa produção inicial de IFN- γ observada nos animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *Lu. longipalpis* poderia contribuir para um controle inicial da infecção observado nestes animais.

Quando consideramos uma proteína da saliva do vetor como componente de uma vacina anti-*Leishmania*, a utilização de proteínas bem conservadas entre diferentes espécies do vetor é de grande importância, uma vez que diferentes espécies de flebotomíneos podem transmitir a mesma espécie do parasita (Killick-Kendrick 1999; Ready 2013). Levando em consideração este critério, a proteína LJM11, que faz parte da família de proteínas “yellow” encontradas na composição da saliva dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, pode ser considerado um candidato em potencial (Xu et al. 2011). Porém, nossos achados indicam que ocorre proteção contra a infecção por *L. braziliensis* somente nos animais imunizados com LJM11 quando a infecção foi realizada na presença da saliva de *Lu. longipalpis*, sugerindo um mecanismo de proteção espécie-específica com relação à composição da saliva do vetor. A imunização de camundongos C57BL/6 com a proteína LJM11 também resultou em uma resposta protetora contra o desafio da transmissão natural da *L. major*. Este trabalho foi pioneiro em demonstrar que a imunização com uma proteína recombinante da saliva de uma espécie de flebotomíneo era capaz de proteger contra o desafio potente da transmissão natural. Neste caso foi utilizado o *Lu. longipalpis*, que não é o vetor natural da *L. major*, mas que contém a LJM11 na composição de sua saliva (Gomes et al. 2012). Porém, ainda não é conhecido se a LJM11 seria capaz de proteger contra a transmissão natural da *L. major* pela picada dos seus vetores naturais: *P. papatasi* ou *P. duboscqi*.

Estudos anteriores têm demonstrado que, com relação à utilização de componentes da saliva como candidatos a vacina, o desenvolvimento de uma resposta protetora também pode variar dependendo das espécies de flebotomíneos utilizados. Em um estudo realizado com *L. amazonensis*, foi demonstrado que a imunização com saliva de *Lu. longipalpis* não foi capaz de proteger quando o desafio foi realizado na presença da saliva de espécies de vetores filogeneticamente mais distantes como *P. papatasi* (Thiakaki et al. 2005). Por outro lado, em um trabalho recente, foi demonstrada proteção cruzada em camundongos BALB/c pré-expostos a picadas de *P. papatasi* que resultou em controle da infecção por *L. major* realizado na presença da saliva do *P. duboscqi* ou *P. papatasi* (Lestinova et al. 2015). Entretanto, outros componentes da saliva de *Lu. longipalpis*, como a proteína LJM19, que demonstrou induzir uma resposta protetora contra a infecção pela *L. braziliensis* no modelo do hamster na presença da saliva de *Lu. intermedia* ou *Lu. longipalpis*, evidenciando seu potencial como candidato a vacina contra a LTA (Tavares et al. 2011). Esta mesma proteína também induziu uma resposta protetora contra a LV em hamsters desafiados com *L. infantum* + SGS de *Lu. longipalpis* (Gomes et al. 2008). Também devemos considerar a identificação de possíveis candidatos da saliva do *Lu. intermedia*, como a proteína Linb-11 presente na saliva do *Lu. intermedia* que foi capaz de proteger camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *Lu. intermedia* (de Moura et al. 2013).

Na avaliação da resposta imune pós-desafio, observamos que, quarenta e oito horas após a infecção, houve maior produção de IFN- γ pelos grupos que foram imunizados com LJM11 nas duas estratégias de infecção, quando estimulados com o parasito, sem diferença significativa entre eles. Foi constatado, ainda, que houve produção de IL-10 somente nos grupos imunizados com BSA e estimulados com *L. braziliensis*. A indução de uma resposta Th1, em conjunto com a produção de IFN- γ já está bem estabelecida como parâmetros essenciais para que uma vacina contra *Leishmania* seja eficaz (Kedzierski et al. 2006). Porém, a razão IFN- γ /IL-10 se mostrou ainda mais importante para prever o sucesso ou falha de uma possível vacina, já que, se essa razão for mantida no curso da infecção, fatalmente favorecerá a eliminação do parasito no hospedeiro (Stober et al. 2005). Nossos resultados sugerem que animais imunizados com a LJM11 foram capazes de gerar uma resposta imune inicial onde ocorre a predominância na produção específica anti-*Leishmania* de IFN- γ , na ausência

de IL-10, o que não foi constatado nos grupos imunizados com BSA, indicando uma resposta imune potencialmente protetora. Porém, a produção de IFN- γ não foi sustentada quando avaliamos novamente a produção das citocinas por células do linfonodo duas semanas pós-infecção. Neste ponto pós-infecção observamos a detecção de IFN- γ apenas nos grupos imunizados com BSA.

Quando avaliamos a expressão de IFN- γ por linfócitos TCD4⁺ observamos um perfil de resposta diferente duas semanas após o desafio onde os animais desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. longipalpis* apresentaram uma expressão mais elevada de IFN- γ (grupo LJM11 com 2,7% e grupo BSA com 3,3%) quando comparado aos animais desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia* (grupo rLJM11 com 0,75% e grupo BSA com 1,7%). Apesar de este resultado ter sido obtido após uma ativação inespecífica (anti-CD3 e anti-CD28) das células do linfonodo, indica uma frequência geral aumentada de IFN- γ quando comparado aos grupos desafiados com *L. braziliensis* + SGS de *Lu. intermedia*, onde não foi observado proteção. Entretanto no grupo controle, desafiado apenas com *L. braziliensis*, houve uma maior frequência de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ (10%), superior ao encontrado em estudos anteriores com a *L. braziliensis* (Moura et al. 2005), evidenciando uma resposta imune celular mais intensa nas primeiras semanas pós-infecção podendo levar a eliminação do parasita assim como contribuir com a destruição tecidual.

Diante desses resultados, nossos dados sugerem que a imunização com a proteína LJM11 encontrada na saliva de *Lu. longipalpis* é capaz de conferir proteção contra a infecção por *L. braziliensis* somente quando o desafio é realizado na presença da saliva de *Lu. longipalpis* e não de *Lu. intermedia*, o vetor natural da *L. braziliensis*. Como perspectivas futuras, realizaremos uma análise mais detalhada da resposta imune, como avaliação de outras citocinas importantes no curso da infecção pela *Leishmania*, tais como TGF- β , IL-17, e IL-12, além da participação de células T multifuncionais (produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2) identificadas como importantes preditoras de proteção mediada por vacinas anti-*Leishmania* (Darrah et al. 2007). Outro ponto importante que também deve ser esclarecido é a proteção parcial observada no grupo imunizado com BSA e desafiado com *L. braziliensis* e saliva de *Lu. longipalpis*. Até o momento nenhum trabalho explorou os mecanismos imunológicos que levam a um controle transitório da infecção quando a infecção pela *L. braziliensis* é realizada na presença da saliva de *Lu. longipalpis*.

Este estudo contribui com o processo de identificação de candidatos a vacina baseada na saliva do vetor e reforça a importância da avaliação destes antígenos na presença do parasita e da saliva do seu vetor transmissor. Desta forma temos uma avaliação mais adequada do verdadeiro potencial de diferentes candidatos em gerar uma resposta protetora, aproximando-se do processo complexo da transmissão da *Leishmania* na natureza que sempre ocorre na presença da saliva do vetor.

X. CONCLUSÃO

A imunização com LJM11 resultou em proteção contra leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* na presença de SGS de *Lu. longipalpis*.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, B.B. & Teixeira, C.R., 2012. Biomarkers for Exposure to Sand Flies Bites as Tools to Aid Control of Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3(May), p.121.
- Ashford, R., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), pp.1269–1281.
- Belkaid, B.Y. et al., 1998. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis : Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. , 188(10).
- Belkaid, Y., Mendez, S., et al., 2000. A Natural Model of *Leishmania major* Infection Reveals a Prolonged “Silent” Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. *The Journal of Immunology*, 165(2), pp.969–977.
- Belkaid, Y., Valenzuela, J.G., et al., 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), pp.6704–6709.
- Bittencourt, A.L. & Barral, A., 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, pp.51–56.
- Bogdan, B.C., Vodovotz, Y. & Nathan, C., 1991. / J __. , 174(December).
- Bogdan, C. et al., 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, 191, pp.2121–2130.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brodskyn, C. et al., 2003. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert review of vaccines*, 2(5), pp.705–17.
- Childs, G.E. et al., 1984. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 78(1), pp.25–34.
- Coutinho, S.G., Pirmez, C. & Da-Cruz, A.M., 2002. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96 Suppl 1, pp.S173–8.

- Darrah, P.A. et al., 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine*, 13, pp.843–850.
- DeKrey, G.K., Lima, H.C. & Titus, R.G., 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 66, pp.827–829.
- Donnelly, K.B., Lima, H.C. & Titus, R.G., 1998. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *The Journal of parasitology*, 84(1), pp.97–103.
- Dumonteil, E., 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2007(6), p.90520.
- Ebrahimpoor, S., Pakzad, S. & Ajdary, S., 2013. IgG1 and IgG2a Profile of Serum Antibodies to *Leishmania major* Amastigote in BALB / c and C57BL / 6 Mice. , 12(December), pp.361–367.
- Flesch, I.E. & Kaufmann, S.H., 1995. Differential induction of IL12 synthesis by *Mycobacterium bovis* BCG and *Listeria monocytogenes*. *Research in immunology*, 146(7-8), pp.520–6.
- Forattini, O.P. et al., 1973. [Note on cutaneous leishmaniasis on the South Coast of São Paulo State, Brazil]. *Revista de saúde pública*, 7(4), pp.447–52. Available at:
- Gomes, R. et al., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp.7845–7850.
- Gomes, R. et al., 2012. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted leishmania conferring ulcer-free protection. *The Journal of investigative dermatology*, 132(12), pp.2735–43.
- Gumy, A., Louis, J. a & Launois, P., 2004. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International journal for parasitology*, 34(4), pp.433–44.
- Handman, E., 2001. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development
Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development.
- Handman, E., Button, L.L. & McMaster, R.W., 1990. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experimental parasitology*, 70(4), pp.427–35. Available at:
- Heinzel, B.Y.F.P. et al., 1989. RECIPROCAL EXPRESSION OF INTERFERON γ OR INTERLEUKIN 4 DURING THE RESOLUTION OR PROGRESSION OF

MURINE LEISHMANIASIS Evidence for Expansion of Distinct Helper T Cell Subsets *Materials and Methods.* , 169(January), pp.59–72.

- Here, L., Milon, G. & Giudice, G. Del, 1995. Immunobiology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Parasitol ogyToday*, 11(7), pp.244–248.
- Iborra, S. et al., 2003. The Leishmania infantum Acidic Ribosomal Protein P0 Administered as a DNA Vaccine Confers Protective Immunity to Leishmania major Infection in BALB / c Mice. , 71(11), pp.6562–6572.
- Kamhawi, S. et al., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5495), pp.1351–1354.
- Kaye, P. & Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), pp.604–15.
- Kedzierski, L., 2011. Leishmaniasis. *Human vaccines*, 7(11), pp.1204–14.
- Kedzierski, L., Zhu, Y. & Handman, E., 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*, 133 Suppl, pp.S87–112. Available at:
- Khamesipour, A. et al., 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *The Indian journal of medical research*, 123(3), pp.423–38.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, pp.279–289.
- Lagranderie, M.R.R. et al., 1996. Comparison of Immune Responses of Mice Immunized with Five Different Mycobacterium bovis BCG Vaccine Strains. , 64(1), pp.1–9.
- Lestinova, T. et al., 2015. Phlebotomus papatasi exposure cross-protects mice against Leishmania major co-inoculated with Phlebotomus duboscqi salivary gland homogenate. *Acta Tropica*, 144, pp.9–18.
- Lewis, D.J., 1970. Phlebotomid Sandflies. , pp.535–551.
- Liew, F.Y., Li, Y. & Millott, S., 1990. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, 71, pp.556–559.
- Marsden PD, 1986. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), pp.859–76.
- Mellanby, K., 1946. Man’s reaction to mosquito bites. *Nature*, 158(4016), p.554.
- Mendonça, M.G. et al., 2004. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *The Journal of infectious diseases*, 189(6), pp.1018–1023.

- Montalban, C. et al., 1989. Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Reviews of infectious diseases*, 11(4), pp.655–60.
- Morais, O.O. De & Roselino, A.M., 2014. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis *. , 89(5), pp.701–709.
- Morgado, F.N. et al., 2008. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology*, 158, pp.50–58.
- Morris, R. V. et al., 2001. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. *The Journal of Immunology*, 167(9), pp.5226–5230.
- Mougneau, E. et al., 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5210), pp.563–6.
- De Moura, T.R. et al., 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2), p.e84.
- De Moura, T.R. et al., 2013. Functional Transcriptomics of Wild-Caught *Lutzomyia intermedia* Salivary Glands: Identification of a Protective Salivary Protein against *Leishmania braziliensis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), p.e2242.
- Moura, T.R. De et al., 2005. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. , 73(9), pp.5827–5834.
- Murray, H.W. et al., 2005. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 73(7), pp.3903–3911.
- Murray, H.W., 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis.
- Murray, H.W., Granger, A.M. & Mohanty, S.K., 1991. Response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis: T cell-dependent but interferon-gamma- and interleukin-2-independent. *The Journal of infectious diseases*, 163, pp.622–624.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y. & Rohermel, C.D., 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon- γ is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation*, 72, pp.1506–1510.
- Noben-Trauth, N., 2000. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunology Letters*, 75(1), pp.41–44.

- Norsworthy, N.B. et al., 2004. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. *Infection and Immunity*, 72(3), pp.1240–1247.
- Oliveira, F. et al., 2006. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine*, 24(3), pp.374–90.
- Oliveira, F. et al., 2008. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(4), p.e226.
- Olobo, J.O. et al., 1995. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* “major surface glycoprotein” (gp63). *Veterinary parasitology*, 60(3-4), pp.199–212.
- Palatnik-de-Sousa, C.B., 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26(14), pp.1709–24.
- Pearson, R.D. & Sousa, A.D.Q., 1996. STATE-OF-THE-ART CLINICAL ARTICLE Clinical Spectrum of Leishmaniasis. , (September 1995), pp.1–13.
- Peters, N.C. et al., 2009. Vector transmission of leishmania abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS pathogens*, 5(6), p.e1000484.
- Ramírez, J.L. & Guevara, P., 1997. Persistent Infections by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. , 92(3), pp.333–338.
- Ramírez, J.R. et al., 2001. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine*, 20(3-4), pp.455–61.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*, 58, pp.227–250.
- Reiner Steven & Locksley, R., 1995. *Leishmania major* the regulation of immunity to. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, pp.151–77.
- Reithinger, R. & Dujardin, J.-C., 2006. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), pp.21–25.
- Ribeiro, J.M., Rowton, E.D. & Charlab, R., 2000. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30(4), pp.271–7.
- Rivier, D. et al., 1999. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: Role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunology*, 21(9), pp.461–473.

- Russell, D.G. & Alexander, J., 1988. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(4), pp.1274–9.
- Sacks, D. & Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*, 2(11), pp.845–58.
- Samuelson, B.J. et al., 1991. A Mouse Model of *Leishmania braziliensis braziliensis* Infection Produced by Coinjection with Sand Fly Saliva. , 173(January), pp.0–5.
- Scott, P.A. & Farrell, J.P., 1982. Experimental cutaneous leishmaniasis: disseminated leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(2), pp.230–8.
- Sérgio, H., Bezerra, S. & Teixeira, M.J., 2001. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera : Psychodidae) Salivary Gland Lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in BALB / c Mice. , 96(April), pp.349–351.
- Stober, C.B. et al., 2005. IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(4), pp.2517–24.
- Tavares, N.M. et al., 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), p.e1169. Available at:
- Teixeira, C. et al., 2014. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), pp.2–11.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M.C. & Titus, R.G., 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity*, 59(5), pp.1592–1598.
- Thiakaki, M. et al., 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 7(4), pp.760–6.
- Titus, R.G. & Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 239, pp.1306–1308.
- Valenzuela, J.G. et al., 2001. Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens: Characterization of a Protective Salivary Protein. *Journal of Experimental Medicine*, 194(3), pp.331–342. Available at:
- Warburg, A. et al., 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 345(1312), pp.223–30.

- Weinkopff, T. et al., 2014. Repeated Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Fly Saliva Induces Local Expression of Interferon-Inducible Genes Both at the Site of Injection in Mice and in Human Blood. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), p.33.
- Xu, X. et al., 2011. Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania* major infection. *The Journal of biological chemistry*, 286(37), pp.32383–93.

XII. ANEXOS

- **ANEXO 1:** Protocolo 027/11 - Ofício do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

- **ANEXO 2:** Artigo: “Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters”. Pereira L, Abbehusen M, Teixeira C, Cunha J, Nascimento IP, Fukutani K et al. 2015. PLoS Negl Trop Dis 10(2): e0003490. Dói: 10.1371/journal.pntd 0003490.