



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO DE HAMSTERS COM
PLASMÍDEOS QUE CODIFICAM COMPONENTES SALIVARES
DE *Lutzomyia longipalpis* (LJM19) E/OU ANTÍGENO
PARASITÁRIO (KMP11) CONTRA A INFECÇÃO COM
*Leishmania chagasi***

ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

Salvador
Setembro de 2008



004074

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA**

**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Tese de Doutorado

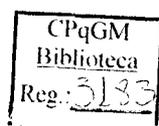
**Avaliação da imunização de hamsters com plasmídeos que codificam
componentes salivares de *Lutzomyia longipalpis* (LJM19) e/ou antígeno
parasitário (KMP11) contra a infecção com *Leishmania chagasi***

Tese apresentada para a
obtenção do grau de Doutor em
Patologia Experimental

ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA IDA BRODSKYN

**Salvador-Bahia-Brasil
2008**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Robson Amaro Augusto da
Avaliação da imunização de hamsters com plasmídeos que codificam
componentes salivares de *Lutzomyia longipalpis* (LJM19) e/ou antígeno parasitário
(KMP11) contra a infecção com *Leishmania chagasi* / Robson Amaro Augusto da
Silva. - 2008.

85 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo
Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. *Leishmania chagasi* 2. Vacina. 3. Hamsters. 4. *Lutzomyia*. I.Título.

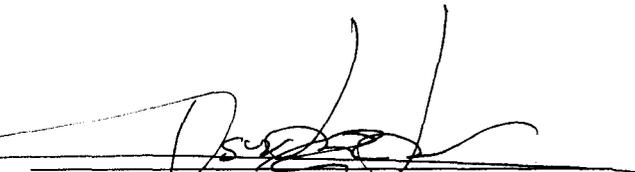
CDU 616.993.161:595.77

“AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO DE HAMSTERS COM PLASMÍDEOS CODIFICANTES PARA COMPONENTES SALIVARES DE *Lutzomyia longipalpis* (LJM19) E/OU ANTÍGENO PARASITÁRIO (KMP11) CONTRA A INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi*”

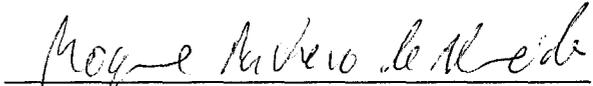
ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

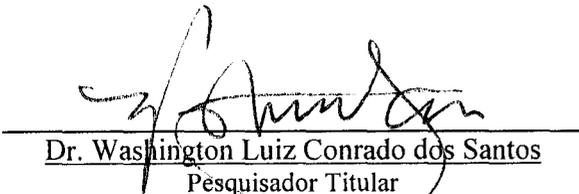
COMISSÃO EXAMINADORA



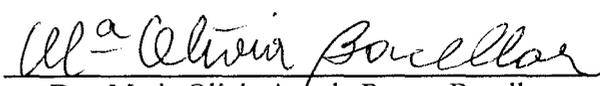
Dr. Oscar Bruna-Romero
Professor Adjunto
UFMG



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Professor Adjunto
UFS



Dr. Washington Luiz Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
FIOCRUZ



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular /Professora Adjunta
FIOCRUZ / UFBA

O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno.

William Shakespeare

A minhas avós, Lindalva Melo (*in memoriam*)
e Maria Belmira pelo exemplo de vida,
força e garra na luta por seus objetivos
bem como pelo amor e compreensão que me
concederam durante toda a minha existência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo sempre.

À Dra. Cláudia Ida Brodskyn pela orientação, boa convivência, compreensão e apoio.

À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida no laboratório e apoio em todos os momentos.

À Dra. Camila Indiani de Oliveira pelos conselhos, discussões, apoio e amizade.

À “Equipe Hamster”: Natália Machado, Dirceu Costa, Maiana Pitombo, Larissa Barbosa. Vocês foram e ainda são um grande presente de Deus na minha vida. Sem vocês na do que foi realizado teria se concluído. Obrigado pelo apoio, palavras certas em momentos difíceis e consolo em momentos de desespero.

Aos “Anexos da Equipe Hamster”: Kyioshi Ferreira, Rômulo, Márcia Weber, Juqueline pro toda ajuda, mão de obra e paciência.

À Tatiana Moura, Fernanda Novais, Cecília Beatriz, Maria José Menezes, Sebastião Martins, Lílian Afonso pelas discussões, terapias em grupo, amizade e companheirismo.

A meus amigos Gilvanéia Silva Santos, Lucas Marques Miranda, Maise Mendonça Amorim e Gyselle Baccan pela convivência, amizade, paciência e ajuda em todos os momentos.

À Dioneire Amparo dos Anjos, Diretora do Instituto Multidisciplinar em Saúde- *Campus* Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia, e à Dra. Laize Tomazi, Chefe do Núcleo de Tecnologia em Saúde pelo apoio e pelos afastamentos concedidos.

Aos professores do Instituto Multidisciplinar em Saúde- *Campus* Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia pela boa convivência e apoio.

Aos meus amigos do LIP-LIMI e da pós-graduação pela ótima convivência e por toda ajuda direta e indireta que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação pelo bom desempenho em suas atividades de ensino.

A Adorielze e Andrezza secretárias do LIP-LIMI por todo apoio.

A Tauar e todo pessoal da secretaria da pós-graduação por toda ajuda fornecida.

Aos funcionários do Biotério pela boa relação e pelo fornecimento dos animais.

Aos funcionários da Biblioteca por todo apoio concedido.

A minha família por todo amor, compreensão e apoio em todas as minhas decisões.

Ao CNPq, a FABESB e à FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

Sumário

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE QUADROS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Leishmaniose.....	16
1.2. Resposta imune contra <i>Leishmania</i>	18
1.3. Modelos experimentais na leishmaniose visceral.....	19
1.3.1. Camundongos.....	20
1.3.2. Cães.....	21
1.3.3. Hamsters.....	23
1.4. O papel da saliva de flebótomos na infecção por <i>Leishmania</i>	25
1.5. Saliva de flebótomos X Vacinas contra a leishmaniose.....	27
1.6. Desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose.....	29
1.6.1. Vacinas de DNA.....	30
1.7. Vias de imunizações: Qual seria a ideal?.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. HIPÓTESE.....	38
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo geral.....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
5. DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
5.1. Desenho experimental I.....	39
5.2. Desenho experimental II.....	40
5.3. Desenho experimental III.....	41
5.4. Desenho experimental IV.....	42
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
6.1. Animais.....	43
6.2. Flebótomos e obtenção do sonicado de glândula salivar (SGS).....	43
6.3. Cultura de <i>Leishmania chagasi</i>	43

6.4. Construção dos plasmídeos de DNA e descrição dos vetores.....	44
6.4.1. Plasmídeo codificante para LJM19 VR2001-TOPO.....	44
6.4.2. pcDNA3 e plasmídeo codificante para KMP11.....	44
6.5. Imunizações e infecção.....	45
6.6. Avaliação da carga parasitária.....	46
6.7. Dosagem de IgG total anti- <i>Leishmania</i>	46
6.8. ELISA para a detecção de IgG anti-SGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	47
6.9. Histopatologia.....	47
6.10. Avaliação hematológica.....	47
6.11. Extração de RNA e preparo de cDNAs para a detecção de citocinas.....	48
6.12. PCR em tempo real.....	48
6.13. Análise estatística.....	50
7. RESULTADOS.....	51
7.1. Resposta humoral de hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19.....	51
7.2. Avaliação da produção de IFN- γ no linfonodo drenante de hamsters imunizados.....	54
7.3. Resposta imune celular em hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	56
7.4. Carga parasitária nos linfonodos drenantes e orelhas em tempos iniciais após a infecção por <i>L. chagasi</i> : resposta humoral nos primeiros momentos pós-desafio.....	57
7.5. Produção de citocinas no linfonodo drenante em tempos iniciais pós-desafio com <i>L. chagasi</i>	60
7.6. Avaliação da carga parasitária em hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	62
7.7. Resposta humoral em hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	64
7.8. Produção esplênica de citocinas em hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	66
7.9. Avaliação histopatológica hepática e esplênica de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	68
7.10. Avaliação hematológica de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com <i>L. chagasi</i>	73

7.11. Comparação de diferentes vias de administração de plasmídeos de DNA: determinação das cargas parasitárias e avaliação da resposta imune humoral de hamsters imunizados e desafiados com <i>L. chagasi</i>	76
8. DISCUSSÃO.....	88
9. CONCLUSÕES.....	103
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
11. ANEXO.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS

LV- Leishmaniose visceral

Th1- “T helper 1”

Th2- “T helper 2”

IFN- γ - Interferon gama

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

IL- Interleucina

TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta

APC- Células Apresentadoras de Antígenos

NK- “*Natural killer*”

RNA- Ácido Ribonucléico

RNA_m- Ácido Ribonucléico mensageiro

DNA- Ácido desoxirribonucléico

cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar

CD 4⁺- Co-receptor de linfócito T auxiliar

CD 8⁺- Co-receptor de linfócito T citolítico

H&E- Hematoxilina & Eosina

SBF- Soro Bovino Fetal

ELISA- Ensaio Imunoenzimático

DTH- do inglês “delayed type hypersensitivity”

rpm- rotações por minuto

LACK- Receptor para cinase C ativada homóloga da *Leishmania*

LJM- *Lutzomyia Jacobina* “Medium cDNA library”

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

KMP11- Proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kilodáltons

PCR- Reação em cadeia da polimerase

SP15- Proteína salivar *Phlebotomus papatasi* 15

SGS- Sonicado de glândula salivar

Th- Linfócito T auxiliar

CN- Controles negativos

ID- Intradérmica

IM- Intramuscular

PV- Plasmídeos vazios

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (modificado de www.wehi.edu.au).

Figura 2. Produção de anticorpos anti-*Leishmania* por hamsters com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19.

Figura 3. Produção de anticorpos anti-saliva por hamsters com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19.

Figura 4. Produção de IFN- γ em linfonodo drenante de hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19.

Figura 5. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) em hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 6. Cargas parasitárias no linfonodo e orelha em tempos iniciais da infecção experimental de hamsters com *L. chagasi*.

Figura 7. Produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters infectados com *L. chagasi*.

Figura 8. Produção de citocinas em linfonodo drenante de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 9. Cargas parasitárias esplênicas e hepáticas de hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*.

Figura 10. Produção de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*.

Figura 11. Produção de citocinas no baço de animais imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 12. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 13. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 14. Cargas parasitárias esplênicas e hepáticas de hamsters imunizados por vias diferentes e desafiados com *L. chagasi*.

Figura 15. Produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters imunizados por diferentes vias infectados com *L. chagasi*.

Figura 16. Produção de citocinas no baço de animais imunizados por diferentes vias e desafiados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 17. Análise histológica de baço e fígado de hamsters imunizados por diferentes vias e infectados com *L. chagasi* mais saliva.

Figura 18. Análise histológica de baço e fígado de hamsters imunizados por diferentes vias e infectados com *L. chagasi* mais saliva cinco meses após o desafio.

Lista de Quadros

Quadro 1. Descrição e identificação dos genes estudados, seqüência dos *primers* utilizados e características do produto de amplificação.

Quadro 2. Leucograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*.

Quadro 3. Eritrograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*.

Quadro 4. Leucograma de hamsters imunizados com plasmídeos por vias diferentes e desafiados com *Leishmania chagasi*.

Quadro 5. Eritrograma de hamsters imunizados com plasmídeos por vias diferentes e desafiados com *Leishmania chagasi*.

RESUMO

Imunização de hamsters com plasmídeos codificantes para componentes salivares de *Lutzomyia longipalpis* (LJM19) e/ou antígeno parasitário (KMP11) protege parcialmente contra a infecção com *Leishmania chagasi*. ROBSON AMARO

AUGUSTO DA SILVA. Hamsters têm sido utilizados como modelos experimentais visando compreender os mecanismos de respostas imunes contra espécies de *Leishmania* do complexo donovani. Estes modelos são capazes de reproduzir muitas das manifestações clínicas da leishmaniose visceral humana. Estudos recentes demonstraram que a imunização de hamsters com plasmídeos codificantes para proteínas salivares (LJM19) de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *L. chagasi*, bem como antígenos parasitários (KMP11) protege hamsters contra um desafio letal com *Leishmania chagasi*. Neste trabalho, hamsters foram utilizados para avaliar o efeito protetor contra uma infecção por *L. chagasi* utilizando imunização com os plasmídeos que codificam as proteínas LJM19 e KMP11 administrados em conjunto. A imunização com os plasmídeos induziu a produção de IFN- γ nos linfonodos drenantes do local das imunizações quando os animais foram avaliados 7, 14 e 21 dias após a última imunização. Uma vez imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva do vetor, os animais mostraram maiores relações IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β nos linfonodos drenantes quando mensuradas 7 e 14 dias após o desafio. Quando avaliados 2 e 5 meses após o desafio, os animais imunizados mostraram menores cargas parasitárias no baço e no fígado e maiores relações IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β no baço 2 meses após o desafio. Além disso, os hamsters imunizados apresentaram maior conservação da arquitetura histológica do baço e do fígado nos tempos avaliados e não desenvolveram distúrbios hematológicos quando comparados com animais controles sadios. Contudo, efeito protetor adicional pela imunização com os diferentes plasmídeos administrados em conjunto não foi observado em relação às imunizações com os plasmídeos separados. Comparações entre rotas de administração de plasmídeos foram estudadas utilizando as vias intradérmica e intramuscular. Os grupos de animais que receberam a imunização intradérmica apresentaram uma proteção mais prolongada quando comparados aos animais imunizados intramuscularmente. Estes resultados mostram que apesar da combinação de plasmídeos não induzir maior proteção que os plasmídeos separados, a via de imunização intradérmica pode conferir uma proteção mais duradoura quando comparada com a imunização pela via intramuscular.

Palavras chaves: Hamster, *Leishmania chagasi*, Leishmaniose visceral, saliva, plasmídeos de cDNA, proteção.

ABSTRACT

Plasmids encoding for *Lutzomyia longipalpis* salivary compounds and kinetoplastid membrane protein 11 partially protects hamsters against *Leishmania chagasi* infection.

ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA. Hamsters are able to reproduce many clinical features observed in human visceral leishmaniasis. This model has been largely used aiming to understand the immune responses against *Leishmania donovani* complex species. Recent reports have shown that hamster immunization with plasmids encoding for *L. longipalpis* salivary gland proteins (LJM19) and plasmids encoding for *Leishmania* parasite antigens (KMP11) can protect these animals against a mortal challenge with *Leishmania*. In this study, hamsters were used to evaluate the existence of additional protection by immunization with these two plasmids administrated together. Plasmids induced IFN- γ production in draining lymph nodes of immunization site 7, 14 and 21 days after the last immunization. Evaluation of immunized and challenged hamsters with *L. chagasi* plus SGS from vector 7 and 14 days after the challenge showed an enhancement of IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β in draining lymph nodes. Two and five months after challenge, immunized animals showed lower parasite loads in liver and spleen and higher IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β relations in the spleen two months after challenge. Moreover, immunized hamsters showed higher liver and spleen morphological preservation and did not develop hematological changes five months after the challenge when compared to healthy control animals. Additional protection was not observed in immunization with plasmids administrated together. Comparison between intradermal and intramuscular route of administration of plasmids was evaluated. Intradermally immunized animals showed a longer protection than intramuscular immunized hamsters. These results show that although plasmids injected together do not induce higher protection than plasmids administrated separately, the intradermal route produce a longer protection than intramuscular route of immunization.

Key words: Hamster, *Leishmania chagasi*, visceral leishmaniasis, saliva, DNA plasmids, protection.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose afeta 12 milhões de indivíduos em todo o mundo constituindo um problema de saúde pública. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco desta infecção, principalmente aquelas residentes em áreas tropicais e subtropicais do planeta (www.who.int/emc/disease/leish/leih.html). Mais de dois milhões de novas infecções são relatadas anualmente, sendo que na última década o número de casos nas áreas endêmicas tem aumentado significativamente. Esta doença se caracteriza por ter um amplo espectro de formas clínicas, variando desde uma infecção assintomática até a forma tegumentar (cutânea e/ ou mucosa) ou visceral. A forma e a severidade da doença dependem da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do organismo (CUNNINGHAM, 2002). Atualmente, acredita-se que, a disseminação da leishmaniose para algumas áreas não endêmicas do mundo pode está relacionada com a co-infecção pelo HIV (CRUZ et al., 2006; MARQUES et al., 2007).

A leishmaniose é transmitida pela picada de insetos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (NEVES et al., 2000) infectados com o parasito durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos e outros animais. No momento do repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro juntamente com produtos da glândula salivar (revisto em TITUS E RIBEIRO, 1998). Há aproximadamente 21 espécies de *Leishmanias*, transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebotomos (CUNNINGHAM, 2002).

O gênero *Leishmania*, um grupo de protozoários flagelados da família Triponosomatidae, ordem Kinetoplastida, apresenta formas morfológicas diferentes nas várias etapas do seu ciclo de vida – a amastigota, a promastigota. A amastigota possui forma redonda ou oval com ausência de flagelo, podendo ser encontrada dentro dos vacúolos lisossomais presentes nas células fagocitárias do organismo vertebrado. Estas células, que podem ser monócitos e/ou macrófagos, são ingeridas pelas fêmeas dos flebotomíneos quando se alimentam de sangue contaminado (revisto em ANDRADE et al., 2007). As formas promastigotas são extracelulares, móveis, estando presente no trato digestivo do inseto flebotomíneo podendo ser inoculadas juntamente com saliva no momento do repasto sanguíneo (**Figura 1**).

As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e se instalam no interior de fagolisossomos, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (revisto em VON STEBUT, 2007). A *Leishmania* tem desenvolvido uma variedade de mecanismos de adaptação, não somente para sobreviver no interior do inseto, mas também, para evadir da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Estas adaptações permitem a sua sobrevivência dentro do macrófago (DE ALMEIDA et al., 2003, CUNNINGHAM, 2002).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de formas clínicas. A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma das formas mais grave, pois, quando não tratada adequadamente determina elevados índices de letalidade. Embora amplamente distribuída no mundo, ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas (www.who.int/emc/disease/leish/leih.html). Espécies que podem causar leishmaniose visceral pertencem ao subgênero *L. (Leishmania)* sendo *L. donovani* e *L. infantum* atuantes no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Embora diferentes no nome e origem geográfica, estudos moleculares mostram que *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie (MAURÍCIO et al., 2000). A maioria dos casos de leishmaniose visceral pode ser atribuída a *L. donovani* e a *L. infantum/chagasi*. Contudo, existe considerável sobreposição das manifestações clínicas causadas pelo gênero *Leishmania* existindo casos de lesões cutâneas causadas por *L. chagasi* e casos de leishmaniose visceral causadas por *L. amazonensis* (BARRAL, 1991) e *L. tropica* (DE ALMEIDA et al., 2003).

Leishmaniose visceral (LV) causada por *L. chagasi* é endêmica em algumas áreas do Brasil, no entanto, a maioria das infecções nestas regiões é subclínica (assintomática). A LV é caracterizada por grande multiplicação do parasito na medula óssea, fígado e baço conduzindo a uma severa perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, e trombocitopenia. O desenvolvimento da doença clínica está possivelmente relacionado com o estado nutricional, idade entre outros fatores (revisado em BARRAL et al., 2000).

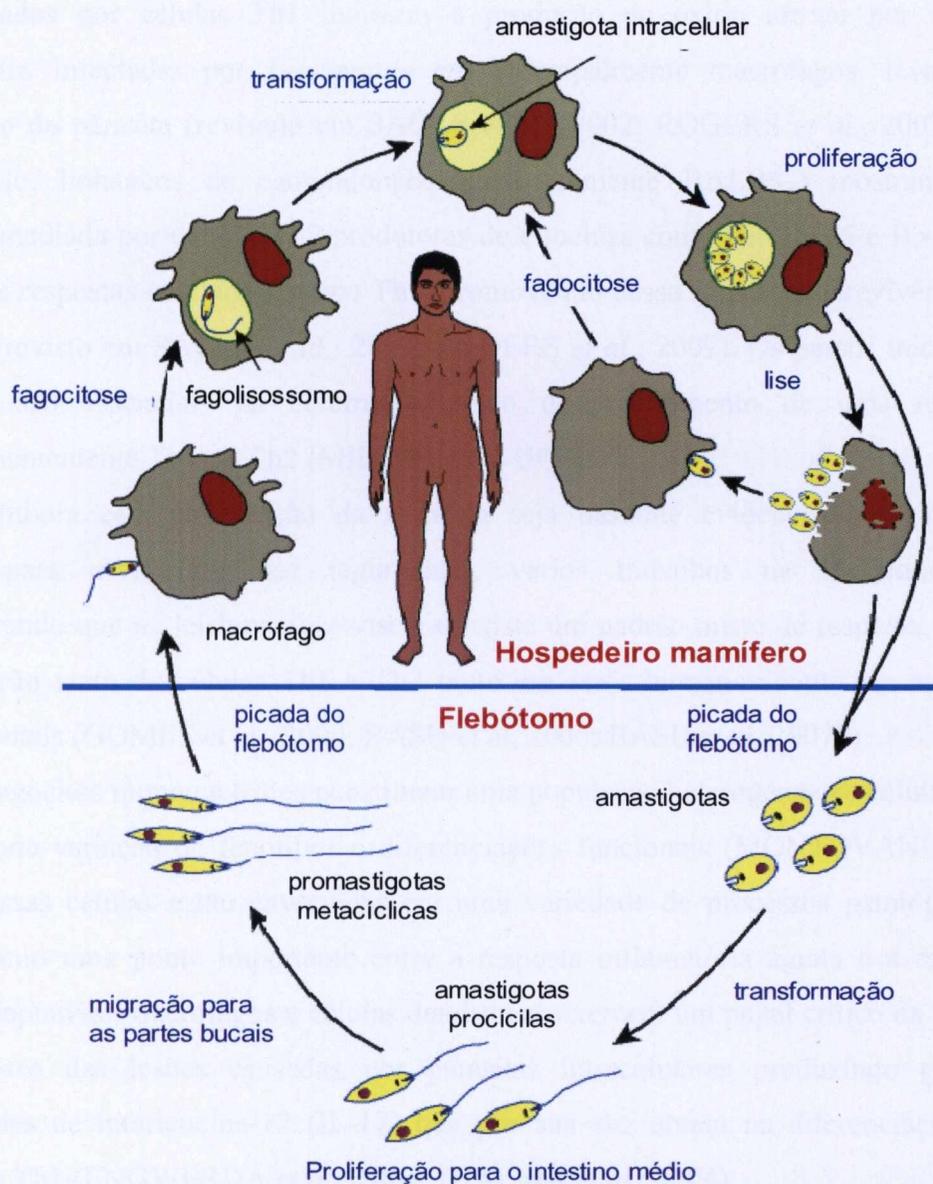


Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (modificado de www.wehi.edu.au).

1.2. Resposta Imune contra a *Leishmania*

A Infecção por *L. major* em camundongos é, talvez, um dos modelos mais estudado de infecção e envolve a ativação de células $CD4^+$ do tipo1 (Th1) e do tipo2 (Th2). Células Th1 e Th2 produzem tipos de citocinas diferentes, células Th1 secretam citocinas ativadoras da imunidade celular como o interferon gama ($IFN-\gamma$), enquanto que células Th2 secretam citocinas como a interleucina 4 (IL-4), promovendo a produção de anticorpos de isotipos específicos (COFFMAMM & MOSSMON, 1986). Linhagens de camundongos que desenvolvem lesões cutâneas auto-limitadas, (C57BL/6, C3H, CBA), mostram uma resposta mediada por células Th1. $IFN-\gamma$ e TNF-

α secretados por células Th1 induzem a produção de óxido nítrico por células fagocitárias infectadas por *Leishmania sp.*, principalmente macrófagos, levando à destruição do parasita (revisado em SACKS *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). Por outro lado, linhagens de camundongos (principalmente BALB/C) mostram uma resposta mediada por células Th2 produtoras de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que inibem as respostas celulares do tipo Th1, promovendo dessa forma a sobrevivência do parasita (revisado em SACKS *et al.*, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). Os passos iniciais da infecção são essenciais na determinação do desenvolvimento de uma resposta predominantemente Th1 ou Th2 (MILON *et al.*, 1995).

Embora esta polarização da resposta seja bastante evidenciada no modelo murino para a leishmaniose tegumentar, vários trabalhos na literatura vêm demonstrando que na leishmaniose visceral existe um padrão misto de resposta, com a participação tanto de células Th1 e Th2 tanto em seres humanos como em modelos experimentais (GOMES *et al.*, 2000; BASU *et al.*, 2005; BASU *et al.*, 2007b).

Fagócitos mononucleares constituem uma população heterogênea de células com uma grande variação de fenótipos e diferenciações funcionais (MONTOVANI *et al.*, 2002). Essas células estão envolvidas em uma variedade de processos patológicos e atuam como uma ponte importante entre a resposta inflamatória aguda e a resposta inune adaptativa. Macrófagos e células dendríticas exercem um papel crítico na gênese e progresso das lesões causadas por parasitas intracelulares produzindo grandes quantidades de interleucina-12 (IL-12) que por sua vez atuam na diferenciação dos linfócitos Th1 (ENGWERDA *et al.*, 2004; DJALMA *et al.*, 2004).

As citocinas são fatores críticos que regulam a diferenciação de células T CD4⁺, sendo a IL-12 um fator chave para a polarização Th1. Esta citocina é um heterodímero (p70) composto por p40 e p35. A sinalização pelo receptor de IL-12 induz pela fosforilação da serina e respostas biológicas mediadas por STAT4. A IL-12 induz a produção de IFN- γ principalmente por linfócitos T e por células NK (“Natural Killer” - NK) (revisado em BASTOS *et al.*, 2004; UDEY, 2004).

1.3. Modelos experimentais na Leishmaniose Visceral

Muitos modelos para a leishmaniose visceral (LV) têm sido testados. No entanto, nenhum deles reproduz totalmente o que acontece em seres humanos. Geralmente cada modelo será capaz de reproduzir parte ou determinada característica da forma clínica encontrada em seres humanos. Os modelos experimentais mais

importantes para a LV são camundongos BALB/c, hamsters, cachorros e macacos. Para cada animal de laboratório utilizado, o desfecho da infecção irá depender de uma combinação de fatores como a espécie de *Leishmania* injetada, a virulência do parasito, o tamanho do inóculo e a rota de infecção. A seguir discutiremos os principais modelos animais utilizados para estudar a infecção experimental por *Leishmania sp.* que leva a forma visceralizante.

1.3.1. Camundongos

Roedores têm sido extensivamente utilizados no estudo de infecções com *L. donovani*. No entanto, a infecção por *Leishmania chagasi/infantum* tem sido explorada discretamente. Camundongos não isogênicos são resistentes à infecção por *L. donovani*. Diferentes linhagens de camundongo apresentam um padrão de resistência ou susceptibilidade à infecção por esta apresentação de *Leishmania*. Entretanto, mesmo as linhagens susceptíveis são capazes de controlar a infecção (BARBOSA et al., 1987). Assim, camundongos constituem bons modelos para o estudo de formas subclínicas ou auto-limitantes da doença.

Embora alguns artigos tenham subestimado as semelhanças e diferenças existentes entre infecções causadas por *L. major* e *L. donovani/chagasi/infantum*, as avaliações realizadas em camundongos conduziram a caracterização de mecanismos imunológicos importantes contra estes parasitas (WILSON et al., 2005; GARG et al., 2006). Assim, o desenvolvimento de respostas imunes órgão-específicas capazes de levar ao depuramento dos parasitas no fígado porém não no baço, foram observados neste modelo (KAYE et al., 1995).

Em camundongos, a infecção é obtida pela inoculação de parasitas por vias como a intradérmica, subcutânea ou intravenosa (AHMED et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004). No entanto, um fato marcante na leishmaniose visceral murina é a taxa de crescimento de parasitas nos órgãos infectados. Durante a infecção por *L. chagasi*, as formas amastigotas proliferam rapidamente no fígado pelas quatro primeiras semanas pós-infecção, mas são destruídas na oitava semana (WILSON et al., 1996). A resolução e o crescimento parasitário no fígado é mais acelerado em camundongos infectados com amastigotas de *L. donovani*, mas o padrão de crescimento acelerado e de cura hepática espontânea é similar (SQUIRES et al., 1989). Contudo, a replicação parasitária começa mais tardiamente e permanece no baço, onde as amastigotas podem persistir por toda a vida do animal (ENGWERDA et al., 2000).

Resistência e susceptibilidade estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de respostas mediadas por células T. Camundongos deficientes em linfócitos T manifestam formas sistêmicas da doença conduzindo à morte (HOWARD et al., 1980). A resolução da doença no fígado está correlacionada com a produção de granulomas (SQUIRES et al., 1989; WILSON et al., 1996; ENGWERDA et al., 2000). A replicação parasitária inicial no fígado e no baço ocorre devido à baixa produção de IFN- γ e IL-12 (MELBY et al., 2001). No entanto, o aumento no número de células produzindo IFN- γ , IL-12p40 e expressão de iNOS correlaciona-se ao início do controle do crescimento parasitário (BELKAID et al., 2000). Diferentes estudos têm mostrado que o desenvolvimento de granulomas no fígado de camundongos infectados requer a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, IL-12, IFN- γ e IL-2. A morte de parasitas dentro dos granulomas depende da presença de monócitos oriundos da corrente sanguínea e da produção de TNF- α . Com a resolução da patologia, o fígado se mostra refratário à reinfeção com o parasita. Após um desafio posterior, granulomas se formam rapidamente com a presença de numerosos linfócitos T CD8⁺ (SQUIRES et al., 1989; MURRAY et al., 1992; MURRAY et al., 2001; GOMES-PEREIRA et al., 2004).

Apesar de diferentes linhagens de camundongo infectadas com *L. donovani* ou *L. chagasi* serem amplamente utilizadas como modelo de estudo da leishmaniose visceral estes animais controlam a infecção (SQUIRES et al., 1989; WILSON et al., 1996; ENGWERDA et al., 2000). Em humanos, a LV apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas indo desde formas controladas ou assintomáticas da patologia até a doença progressiva. O modelo utilizando camundongos é comparável às formas controladas da doença ou oligossintomáticas e desta forma é útil para o entendimento de como respostas imunes protetoras são geradas. No entanto, quando se almeja o desenvolvimento de vacinas, modelos que desenvolvam a forma progressiva da patologia são úteis por apresentarem muitas das características clínicas apresentadas em seres humanos infectados.

1.3.2. Cães

O cão tem sido considerado como a parte mais susceptível no ciclo de transmissão da *Leishmania infantum*. O desenvolvimento de LV em cães é muito variável. Alguns animais podem desenvolver infecção sintomática resultando em morte, enquanto outros permanecem assintomáticos ou desenvolvem sintomas menos graves sendo chamados de oligossintomáticos (revisto em BARBIÉRI, 2006). Cães infectados,

oriundos da mesma área endêmica podem desenvolver diferentes tipos de respostas como avaliado por hipersensibilidade tardia (DTH) em reação ao teste cutâneo com antígeno de *Leishmania* (CARDOSO et al., 1998). Após um período de incubação de 2-4 meses, cachorros com doença progressiva desenvolvem linfadenopatia, dermatite, onicogribose, perda de peso, problemas de locomoção, conjuntivite, epistaxe, hipergamaglobulinemia e deficiência na resposta imune mediada por células (CIARAMELLA et al., 1997). Os mecanismos que conduzem a proteção ou susceptibilidade à doença não são totalmente conhecidos. No entanto, a imunidade celular, mediada principalmente por células Th1, é capaz de controlar a infecção e os animais permanecem assintomáticos (PINELLE et al., 1994).

Cães com manifestações clínicas de leishmaniose são tratados ou eutanasiados. Entretanto, a eliminação de cães infectados não se correlaciona com a diminuição do número de casos humanos, sugerindo que outras medidas de controle devem ser implementadas (VIEIRA & COELHO, 1998; COSTA & VIEIRA, 2001). O tratamento da leishmaniose canina é de baixa eficiência, independente se antimoniais ou anfotericina são utilizados. Embora a maioria dos cães aparente resolver a doença clinicamente, não ocorre cura esterilizante. Recidivas ocorrem em até 80% dos cães tratados em um ano (MORENO & ALVAR, 2002). Interessante é que um número significativo (30%) dos cachorros tratados, mesmo quando não exibem qualquer sintomatologia clínica, podem se reinfectar pela picada de flebótomos 3 a 5 meses após o último tratamento (ALVAR et al., 1994). Os fármacos podem conduzir ao depuramento dos parasitas circulantes e conseqüentemente restaurar os níveis de linfócitos T CD4⁺. A redução da carga parasitária reduz o risco de transmissão da doença. Com a parada do tratamento, os parasitas retomam o crescimento permitindo a propagação de amastigotas e a infecção de flebotomíneos (GUARGA et al., 2002). O desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados, bem como a recorrência do risco de transmissão se constituem, desta forma, duas implicações epidemiológicas conseqüentes.

Cães constituem um excelente modelo de estudo para a leishmaniose. Estes animais são um bom modelo, pelo fato de reproduzirem muitos os sintomas observados em humanos, com exceção da alopecia e onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997). Assim, progressos no conhecimento da leishmaniose canina podem ajudar a prevenir a doença em humanos (HOMMEL et al., 1995). Desta forma, a recente clonagem de vários genes caninos codificantes para citocinas e outros marcadores celulares

importantes imunologicamente, bem como o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para estas moléculas. têm estimulado a continuidade com os estudos utilizando este modelo (BUENO et al., 2005; GARG et al., 2006). Contudo, o elevado custo de manutenção associado à dificuldade de obtenção de animais em grande escala são fortes desvantagens para a utilização do cão como modelo experimental para a leishmaniose visceral.

1.3.3. Hamsters

O hamster sírio tem mostrado ser um excelente modelo experimental para uma série de patologias humanas, incluindo sífilis, leishmaniose, micobactérias, micoses e arboviroses. Para vários deste patógenos, como o *Treponema pallidum*, não existe outro modelo experimental disponível. O motivo para esta extrema susceptibilidade ainda não está esclarecida. No entanto, relatos recentes reportam que uma reduzida atividade da óxido nítrico sintetase (iNOS) destes animais pode torná-los incapazes de controlar infecções por patógenos intracelulares (PEREZ et al., 2006).

Uma vez infectados com formas visceralizantes de *Leishmania*, hamsters desenvolvem uma doença progressiva em que o parasita se replica amplamente no fígado, baço e medula óssea o que pode eventualmente conduzir à morte (GOSH et al., 1987). Surpreendentemente há uma quantidade significativa de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , IL-2 e TNF- α sendo expressas por esplenócitos de hamsters infectados com *L. donovani*. Embora possuindo baixa ou nenhuma expressão de IL-4, quantidades substanciais de mRNA para TGF- β e IL-10 estão presentes. Além do mais, há uma expressão diminuída de mRNA codificante para NOS2 e uma baixa geração de NO em hamsters infectados (MELBY et al., 2001; PEREZ et al., 2006). Assim, a incapacidade em controlar a infecção ser relaciona com falhas nas funções efetoras dos macrófagos infectados (PEREZ et al., 2006).

Hamsters apresentam uma infecção progressiva por *L. donovani* ou *L. chagasi/infantum* e apresentam muitas das manifestações clínicas desenvolvidas por humanos. Semelhante aos seres humanos, estes animais desenvolvem anemia, leucopenia, trombocitopenia, caquexia associada com o acúmulo de parasitas nos vísceras, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia e se nenhuma medida terapêutica for iniciada sucumbem e morrem (GOSH et al., 1987; PEARSON et al., 1990; MELBY et al., 2001). Contudo, muitos hamsters desenvolvem ascite severa antes de sucumbirem e estudos histológicos têm revelado a presença de glomerulonefrite

mediada por imunocomplexo e amiloidose disseminada, que podem conduzir ao desenvolvimento de síndrome nefrótica (SARTORI et al., 1991). Embora glomerulonefrite mediada por imunocomplexos tenha sido observada histologicamente em seres humanos e em cães com leishmaniose visceral, falência renal e síndrome nefrótica são achados raros (PEARSON et al., 1996).

O baço é um órgão extremamente atingido por deposições amilóides ocupando praticamente toda a polpa vermelha (RIÇA-CAPELA et al., 2003). Na fase inicial da infecção, a estrutura do baço apresenta-se normal e o fígado mostra uma discreta inflamação caracterizada por um infiltrado periportal com predomínio de células mononucleares. No entanto, durante o pico parasitário ocorre uma desorganização das arquiteturas esplênica e hepática. Morfologicamente é possível observar uma desorganização com hipoplasia da polpa branca esplênica com um infiltrado eosinofílico na polpa vermelha. Granulomas hepáticos com progressivo parasitismo de macrófagos são observados no fígado. Um infiltrado plasmocitário periportal aumenta de intensidade à medida que a infecção se cronifica (RIÇA-CAPELA et al., 2003). A presença de imunocomplexos da doença visceral em hamsters também tem sido observada no pulmão e no fígado destes animais (MATHIAS et al., 2001).

Assim como em camundongos, hamsters têm sido utilizados para estudar diversas formas de leishmaniose causadas por parasitas variados (NEAL & HALE, 1981; CHILDS et al., 1984; GIFAWESEN et al., 1989; LINDOSO et al., 2004). Diferentes rotas de infecção têm sido utilizadas sendo as mais comuns a intradérmica, a intracardiaca, a intraperitoneal (VIRMODES et al., 1998; MATHIAS et al., 2001; SHARMA et al., 2004; IÑIGUEZ et al., 2006). Por serem altamente susceptíveis têm sido utilizados em estudos de fármacos, vacinas e mecanismos de imunossupressão (SHARMA et al., 2004; SINGH et al., 2005; BASU et al., 2005; GARG et al., 2006). Por serem animais de fácil manipulação, de manutenção prática e relativamente barata, a possibilidade de obtenção destes animais em grande escala em curtos períodos de tempo e o tipo de resposta observada frente a estas infecções têm tornado estes vertebrados cada vez mais úteis em pesquisas. Entretanto, a carência de muitos reagentes e anticorpos é um obstáculo que ainda vem sendo enfrentado, limitando muito as respostas obtidas planejadas em desenhos experimentais. Alguns destes obstáculos têm sido superados utilizando novas abordagens moleculares para a avaliação imunológica destes animais (MELBY et al., 1998; MELBY et al., 2001).

1.4. O papel da saliva de flebotomos na infecção por *Leishmania*

Durante o repasto sanguíneo os vetores inoculam parasitas juntamente com pequenas quantidades de saliva. A saliva destes insetos possui uma variedade de componentes com atividade farmacológica que ajudam o flebotomíneo a vencer os processos homeostáticos dos hospedeiros vertebrados (RIBEIRO et al., 1987; RIBEIRO et al., 1995). A hemostasia do hospedeiro vertebrado é altamente eficiente e inclui uma variedade redundante de vias geradas para evitar a perda sanguínea nos sítios de lesão, sendo estas vasoconstricção, agregação plaquetária e formação de coágulo (RIBEIRO et al., 1987; RIBEIRO et al., 1995). Para superar estes obstáculos, artrópodos hematófagos desenvolveram uma variedade de moléculas anti-coagulante, vasodilatadoras e de atividade anti-agregante plaquetária que são encontradas em suas secreções salivares (CHAMPAGNE, 1994; RIBEIRO et al., 1995; STARK & JAMES, 1996; KAMHAWI, 2000). Muitas destas moléculas são imunogênicas e induzem a produção de anticorpos e/ou respostas celulares pró-inflamatórias que reduzem a eficiência do repasto dos vetores artrópodos bem como sua capacidade de transmitir patógenos (WIKEL, 1999). No entanto, algumas outras substâncias presentes na saliva têm mostrado inibir parcialmente tanto a imunidade inata como a adquirida e aumentar a capacidade de patógenos em estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado (CHAMPAGNE, 1994; RIBEIRO, 1989).

As diferentes moléculas presentes na saliva foram capazes de inibir a ativação de células T (THEODOS & TITUS, 1993; TITUS, 1998), de macrófagos (THEODOS & TITUS, 1993), da produção de óxido nítrico e água oxigenada por macrófagos e a destruição intracelular de *L. major* (HALL & TITUS, 1995, WAITUMBI & WARBURG, 1998; GILLESPIE et al., 2000; KATZ et al., 2000; NORSWORTHY et al., 2004). Além disso, observou-se também aumento da quimiotaxia e da fagocitose de *L. major* por macrófagos (ANJILI et al., 1995; ZER et al., 2001), inibição da produção de IFN- γ , IL-12 e iNOS (MBOW et al., 1998) e aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (MBOW et al., 1998; BELKAID et al., 1998; NORSWORTHY et al., 2004). Desta forma, para as mais diferentes espécies de *Leishmania*, a co-inoculação de parasitas com sonicado de glândula salivar (SGS), tanto de *L. longipalpis* como de *Phlebotomus papatasi*, leva a um aumento substancial no tamanho das lesões e/ou cargas parasitárias quando comparadas com os controles inoculados apenas com o parasita (SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; LIMA & TITUS, 1996; BELKAID et al., 1998; DONNELLY et al., 1998; MBOW et al., 1998).

Entre as moléculas de saliva de flebotomos, o maxadilan recebeu bastante atenção. Esta molécula é um potente vasodilatador encontrado na saliva de *L. longipalpis* (LERNER et al., 1991). O maxadilan demonstrou ter vários efeitos sobre diferentes células do sistema imune bem como no desenvolvimento de respostas imunológicas. Os efeitos do maxadilan se manifestam primariamente sobre células fagocitárias (macrófagos e células dendríticas) e conduzem a efeitos inibitórios sobre linfócitos T (TITUS & RIBEIRO, 1990; THEODOS & TITUS, 1993; TITUS, 1998). Assim, atua sobre várias funções dos macrófagos, e contribui para o exacerbamento da infecção permitindo maior sobrevivência da *Leishmania*. Por exemplo, esta molécula inibe a produção de IL-12, NO e TNF- α por macrófagos impedindo a morte dos parasitas (SOARES et al., 1998; ROGERS & TITUS, 2003). Além disso, o maxadilan pode aumentar a produção de IL-6, IL-10 e PGE₂, moléculas que estão relacionadas com o desenvolvimento de respostas do tipo Th2, inibição de macrófagos, aumento da hematopoiese e diminuição da expressão do receptor de IL-12 (RINCON et al., 1997; BOZZA et al., 1998; WU et al., 1998; GUILPIN et al., 2002; ROGERS & TITUS, 2003). Outras moléculas, como apirase e a hialuronidase, também têm mostrado ter papéis imunomodulatórios e suas funções foram amplamente revisadas pela literatura (GILLESPIE et al., 2000; SACKS & KAMHAWI, 2001; ROHOUSOVÁ & VOLF, 2006).

Apesar da *Leishmania* ser transmitida pela picada do flebotomíneo, muitos trabalhos não têm levado em consideração esta via de infecção. Um modelo de infecção por *Leishmania* que utilize a picada do vetor pode superar fatores que ainda são desconhecidos, mas que são importantes na transmissão natural da doença. Estes fatores incluem o desenvolvimento do parasita no interior do artrópodo, o inóculo natural injetado no sítio da picada, a quantidade e a razão correta de componentes salivares liberados no local da picada durante o repasto sanguíneo e o mecanismo, bem como o local exato de inoculação com parasita. Recentemente, foi demonstrado que o desenvolvimento da infecção, bem como da resposta imune em camundongos é diferente quando estes animais recebem o parasita através da picada ou por inóculo realizado com agulhas (KAMHAWI et al., 2000). O fenótipo resistente de camundongos C57BL/6 foi mantido e o mesmo grau de severidade foi observado em animais selvagens ou deficientes em IL-4. Em contraste com a co-inoculação de parasita mais saliva realizada por agulhas, a resposta de células epidérmicas a picadas de

flebótomos infectados mostrou uma expressão menor de IL-4 e a ausência de IL-5 (KAMHAWI et al., 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que humanos podem responder a componentes salivares (BARRAL et al., 2000; GOMES et al., 2002; ROHOUSOVÁ et al., 2005). A atuação de SGS sobre células apresentadoras humanas sugere que a saliva pode influenciar a resposta imune no homem (COSTA et al., 2004). A produção de anticorpos anti-saliva tem sido demonstrada, e esta se relacionada com o desenvolvimento de DTH anti-*Leishmania* por moradores de áreas endêmicas (GOMES et al., 2002). Embora o desenvolvimento de anticorpos anti-saliva seja espécie-específico, a resposta imune humana contra antígenos salivares tem sido sugerida como marcador epidemiológico (BARRAL et al., 2000; ROHOUSOVÁ et al., 2005). Assim, se a saliva pode influenciar o desenvolvimento da infecção favorecendo o parasita, a indução de resposta imune contra componentes salivares poderia neutralizar seus efeitos exacerbadores e desta forma servir como mecanismo protetor favorecendo o hospedeiro vertebrado (LIMA & TITUS, 1996; BELKAID et al., 1998; SACKS, 2001; MORRIS et al., 2001; THIAKAKI et al., 2005; TITUS et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

1.5. Saliva de Flebótomos X Vacinas conta Leishmaniose

Habitantes de áreas endêmicas para leishmaniose são conhecidos por mostrarem infecções atenuadas, enquanto que novos moradores ou visitantes destas áreas endêmicas desenvolvem doenças mais agressivas. Relatos recentes sugerem que a história de exposição a picadas de flebótomos, e assim o contato com sua saliva, pode influenciar o comportamento da infecção. Alguns investigadores mostraram que a imunidade desenvolvida contra componentes salivares permite que o hospedeiro vertebrado desenvolva uma proteção contra a infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 1998; KAMHAWI et al., 2000; VALENZUELA et al., 2001). Este fato conduziu à possibilidade de que a vacinação com componentes salivares do vetor inibiria a transmissão de *Leishmania*. Realmente, a pré-exposição a componentes salivares de flebótomos diminuiu o risco de desenvolver formas mais grave da doença em camundongos (BELKAID et al., 1998; KAMHAWI et al., 2000). Estes dados indicam que medidas alternativas de imunização com componentes salivares podem oferecer um novo método para o controle da leishmaniose.

Morris e colaboradores, 2001, mostraram que camundongos imunizados com maxadilan recombinante são protegidos contra um desafio posterior realizados com *L. major* mais saliva de *L. longipalpis*. Da mesma forma, outros trabalhos mostraram que uma proteína da saliva de *P. papatasi*, SP15, foi capaz de ser reconhecida por anticorpos produzidos por camundongos. Uma vez imunizados com plasmídeos de DNA codificantes para esta proteína, camundongos foram protegidos contra um desafio com *L. major* (VALENZUELA et al., 2001). Esta proteção foi observada mesmo em linhagens deficientes em linfócitos B, demonstrando que anticorpos não foram requeridos para a proteção e que a resposta imune celular foi suficiente para evitar o desenvolvimento da doença (VALENZUELA et al., 2001). Assim, embora anticorpos humanos específicos anti-saliva tenham correlacionado com o aparecimento de imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania*, um maior conhecimento sobre o papel de anticorpos anti-saliva na infecção por *Leishmania* é importante para o pleno entendimento dos eventos que acontecem durante a infecção (GOMES et al., 2002).

A proteção conferida pela pré-exposição de camundongos à saliva foi associada a uma forte DTH contra a saliva desenvolvida no local de inóculo de parasitas. A reação de DTH é conhecida por ser induzida pelas picadas de *P. papatasi* em humanos (SACKS & KAMHAWI, 2001). A proteção de camundongos contra *L. major* utilizando a pré-exposição a picadas também foi associada a uma forte produção de IFN- γ e IL-12 no local da picada, o que sugere que dentro deste ambiente inflamatório, macrófagos infectados podem ser ativados e assim são capazes de destruir os parasitas intracelulares. A promoção de uma resposta do tipo Th1 também pode estar implicada. Assim, a proteção contra infecção por *Leishmania* conferida por picadas de flebótomos não infectados em áreas endêmicas, poderia, a princípio, explicar porque moradores destas regiões desenvolvem quadros menos graves que visitantes.

Sabendo deste comportamento do sistema imune em resposta aos componentes salivares de flebótomos, um grande esforço tem sido realizado na intenção de se identificar quais os componentes mais abundantes na saliva destes vetores e, quais seriam responsáveis por fornecer respostas imunes protetoras contra a infecção por *Leishmania* (VALENZUELA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, muito cuidado deve ser tomado ao se eleger um candidato, pois, o antígeno salivar que induz resposta imune protetora em modelos animais nem sempre é o mesmo que induzirá resposta em humanos (ROHOSOUVÁ et al., 2005). Outro fator importante é a grande variação antigênica presente na saliva dos diferentes tipos de flebótomos presentes nas

mais diversas regiões geográficas o que pode suscitar padrões de respostas também diferenciados (ROHOSOUVÁ et al., 2005; THIAKAKI et al., 2005; ROHOSOUVÁ & VOLF, 2006).

Os componentes salivares diferem em sua capacidade de induzir uma resposta imune eficiente contra a infecção. Eles podem induzir geração de anticorpos ou DTH ou as duas formas de respostas (OLIVEIRA et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que plasmídeos de cDNA que codificam proteínas salivares capazes de induzir grande produção de anticorpos não foram capazes de proteger hamsters contra infecção por *L. chagasi* (GOMES et al., 2008). No entanto, plasmídeos codificantes para proteínas indutoras de forte DTH (LJM19) foram capaz de proteger hamsters por mais de 5 meses após terem sido desafiados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis* (GOMES et al., 2008). Baseando-se nestes dados, notamos que a proteção induzida por proteínas salivares está mais relacionada com uma resposta imune mediada por células (VALENZUELA et al., 2001).

1.6. Desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose

O fato de seres humanos desenvolverem uma imunidade protetora e de longa durabilidade após terem sido curados de lesões cutâneas causadas por parasitas do gênero *Leishmania* demonstra que a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra esta patologia é factível. Para prevenir o desenvolvimento de lesões cutâneas em partes expostas do corpo, alguns países passaram a adotar a leishmanização como um método profilático nas décadas de 70 e 80. Embora este método de imunização tenha caído em desuso, alguns países, como o Uzbequistão, continuam a usar esta medida profilática atualmente (KHAMESIPOUR et al., 2006). Neste processo, utilizam-se formas vivas virulentas extraídas de lesões ativas com *Leishmania major*. Misturadas com parasitas mortos, esta formulação é administrada à população poucos meses antes das épocas de maior incidência da doença (GAFUROV, 1999). A falta de padronização e qualidade de controle são problemas constantemente associados a este tipo de imunização.

Usando formas de *L. major* não mutadas para a leishmanização, a lesão deve se desenvolver antes do aparecimento de uma imunidade protetora. No entanto, a existência de relatos que mostram a possibilidade de geração de uma imunidade protetora em camundongos vacinados com formas mutantes de parasitas incapazes de produzir lesões tem chamado a atenção da comunidade científica (DANESHVAR et al.,

2003; POLOCK et al., 2003). Diferentes trabalhos têm mostrado que cepas de *Leishmania* deficientes em algum fator de virulência podem causar patologias menos agressivas e gerar respostas imunes favoráveis ao hospedeiro vertebrado (DA CRUZ et al., 1991; MOTTRAN et al., 1996; ALEXANDER et al., 1998; PAPADOPOULOU et al., 2002; POLOCK et al., 2003).

1.6.1 Vacinas de DNA

A imunização com DNA foi introduzida em 1990 por um estudo que demonstrava a indução de expressão de proteínas, após injeção intradérmica de plasmídeos de DNA, em miócitos (WOLFF et al., 1990). Plasmídeos de DNA permitem a expressão de proteínas em células de mamíferos após a introdução das construções de DNA codificando o antígeno protetor. Imunidade protetora conferida por imunização com plasmídeos de DNA tem sido observada em vários modelos de patologias incluindo HIV, tuberculose, câncer e *Leishmania* (LEE et al., 2004; TARACHA et al., 2003; PAVLENKO et al., 2004; IBORRA et al., 2005). O uso de plasmídeos de DNA codificando genes candidatos à vacina possui uma grande variedade de vantagens quando comparados com os efeitos indesejáveis da administração de patógenos ou de proteínas recombinantes.

Neste contexto, o uso de plasmídeos de DNA objetivando a vacinação possui várias vantagens em relação às formulações tradicionais que são aplicadas para o desenvolvimento de vacinas. Vacinas de DNA, também conhecidas como vacinas “genéticas”, “de ácidos nucleicos” ou “de polinucleotídeo” capacitam a produção de antígenos *in vivo*. Conseqüentemente, tanto uma resposta imune humoral como uma resposta celular são geradas (AZEVEDO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 1999; O’HAGAN & RAPPUOLI, 2004; GARMORY et al., 2005). Além do mais, a possibilidade de manipular geneticamente o DNA oferece a vantagem de criar vacinas desenhadas para a geração de moléculas co-estimulatórias, citocinas ou de direcionar a produção das proteínas alvo em compartimentos celulares desejados. Estes fatores podem direcionar o tipo de resposta imune a ser desenvolvida. Também é possível gerar vacinas de DNA multicompetentes, capazes de codificar diferentes antígenos e estimular a geração de imunidade contra uma variedade de patógenos ou fases do ciclo celular de um mesmo agressor. A velocidade com que a manipulação gênica pode ser conduzida pode oferecer uma produção rápida de diferentes tipos de vacinas. Em comparação, a produção de formas mutantes atenuadas para propósitos vacinais é muito

mais prolongado e complicado. Outras vantagens oferecidas pelos plasmídeos de DNA em relação às formulações com proteínas são facilidades para estoque sem perda de potência e possibilidade de produção em larga escala com custo relativo baixo (AZEVEDO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 1999; O'HAGAN & RAPPUOLI, 2004; GARMORY et al., 2005).

Diferentes antígenos têm sido testados almejando uma proteção contra a leishmaniose visceral (CARTER et al., 2007; MORENO et al., 2007; GOMES et al., 2007). A imunização de hamsters com plasmídeos codificantes para KMP11, uma proteína altamente conservada em tripanosomatídeos, foi capaz de proteger estes animais contra desafios realizados com leishmanias resistentes ou sensíveis ao glucantime (JARDIM et al., 1995; BASU et al., 2005). Todos os animais imunizados com este plasmídeo sobreviveram ao desafio mostrando cargas parasitárias muito reduzidas no fígado e no baço quando comparadas com as dos grupos controles. Além disso, os hamsters apresentaram produção elevada tanto de citocinas relacionadas com o padrão Th1 como Th2. Assim, altas concentrações de IFN- γ e IL-4 e baixa produção de IL-10 apontam para proteção contra o parasita (BASU et al., 2005). Da mesma forma, o tratamento de camundongos com células híbridas expressando KMP11 curou camundongos infectados com *L. donovani* pela geração de uma forte resposta mediada por células T CD8⁺ (BASU et al., 2007b). O reconhecimento destes antígenos por células citolíticas humanas pelo MHC classe I torna o KMP11 um forte candidato para desenhos experimentais visando o desenvolvimento de vacinas em humanos (TOLSON et al., 1994; BASU et al., 2007a). Por outro lado, a imunização de cachorros com plasmídeos codificando KMP-11, TSA, LACK e GP63 não foi capaz de conferir proteção contra um desafio experimental com *Leishmania infantum* (RODRÍGUES-CORTÉS et al., 2007).

Melby e colaboradores, 2006, demonstraram que cães imunizados pela via intramuscular com plasmídeos codificantes para dez antígenos diferentes de *Leishmania* (H1, H2A, H2B, H3, H4, LACK, PSA-2, TSA, ST11 e ARP-1) tiveram linfoproliferação induzida por antígeno e produção de IFN- γ , mas não de IL-4. Estas respostas não foram incrementadas com a co-administração de plasmídeos codificantes para IL-12 ou GM-CSF. Esta vacina multipotente foi capaz, também, de induzir uma resposta de hipersensibilidade tardia contra promastigotas viáveis de *L. donovani* e a redução das cargas parasitárias num modelo intracelular *in vitro* e nos linfonodos drenantes após desafio cutâneo.

Estudos recentes, utilizando camundongos como modelo experimental, demonstraram que a imunização com plasmídeos codificantes para nucleotídeo hidroxilase (NH36), a porção mais imunogênica do complexo fucose-manose de *L. donovani*, foi capaz de induzir uma redução na carga parasitária de 88% em animais desafiados com *Leishmania chagasi*. No mesmo estudo, foi demonstrado que animais desafiados com *Leishmania mexicana* desenvolveram lesões 65% menores que as observadas nos animais controles (AGUILAR-BE et al., 2005). Estas proteções foram correlacionadas com um aumento de duas a cinco vezes na população de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ indicando um tipo de resposta do tipo Th1 nos camundongos imunizados com o plasmídeo (AGUILAR-BE et al., 2005). Por outro lado, plasmídeos codificantes para a nucleotídeo hidroxilase mostraram menor eficiência na proteção contra *L. amazonensis* e *L. chagasi* quando comparado com a imunização com plasmídeos codificantes para a proteína A2 (ZANIN et al., 2007). Esta proteína é altamente conservada em espécies de *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (GHEDIN et al., 1997). Diferentes estudos realizando a imunização com a proteína recombinante ou com plasmídeos de DNA codificantes para A2 têm mostrado a capacidade de proteger camundongos BALB/c contra o desafio com *L. amazonensis* ou com *L. donovani* (GHOSH et al., 2001; GHOSH et al. 2002; COELHO et al., 2003).

Desta forma, na presença de diversos antígenos com capacidade de induzir respostas imunes relacionadas com proteção, bem como o potencial de plasmídeos de DNA para o desenvolvimento de vacinas outro ponto vem chamando a atenção de diferentes pesquisadores: a diferença das respostas imunes observadas quando imunógenos são inoculados por vias diferentes.

1.7. Vias de imunização: Qual seria a ideal?

Muitos estudos mostram que diferentes desfechos da patologia envolvendo *Leishmania* estão diretamente relacionados com a virulência da cepa, a espécie de parasita utilizada, a natureza do inóculo e a rota de inoculação do patógeno. A influência da rota do inóculo no desencadeamento da doença é uma consideração importante e sendo assim, uma variedade de rotas têm sido utilizadas nos estudos experimentais. As vias intradérmica (i.d.), subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.) e a intracárdica são as mais freqüentemente usadas (SAMUELSON et al., 1991; BELKAID et al., 1998; AFRIN et al., 2000; SHARMA et al., 2004). Neste contexto, muito também tem sido questionado acerca das rotas de imunização com plasmídeos e

qual seria aquela que traria os melhores parâmetros de proteção nos modelos estudados (O'HAGAN & RAPPUOLI, 2004; GARMORY et al., 2005).

A via pela a qual os plasmídeos de DNA são inoculados tem efeitos na magnitude e no tipo de resposta imune gerada. Especificamente, o método e a rota de inoculação podem influenciar a imunogenicidade das vacinas (GARMORY et al., 2005). Neste contexto, a pele tem mostrado ser um bom alvo para estudos com vacinas (HUNSAKER & PERINO, 2001; DONDJH et al., 2005). O grande número de células apresentadoras de antígenos pode facilitar a interação dos plasmídeos com células efetoras da resposta imune e ativar mecanismos envolvidos na geração de respostas protetoras. Além disso, este contato pode induzir a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. A pele é rica em um grande número de mastócitos, macrófagos, células dendríticas. A riqueza de vasos no tecido conjuntivo pode facilitar também o influxo de outras células, como neutrófilos. A riqueza em células dendríticas é um fator crítico para geração de respostas imunes eficientes, uma vez que, estas células possuem papel fundamental na ligação das respostas imune inata e adaptativa (HARIZI & GUALD, 2005; ASAHINA & TAMAKI, 2006; VON STEBUT, 2007). Possuindo uma grande capacidade de produção de IL-12 elas podem direcionar a resposta para um tipo protetor Th1 (ZIMMERMANN et al., 2007). Por outro lado, as células dendríticas e as células de Langerhans podem ser diretamente transfectadas com os plasmídeos de DNA injetados (CASARES et al., 1997).

Tendo uma alta expressão de moléculas co-estimulatórias, estas células podem promover a ativação de linfócitos T virgens. Uma vez com o antígeno estas células são capazes de realizar apresentação cruzada utilizando moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I) para induzir a ativação de linfócitos T CD8⁺ (ALBERT et al., 1998; JUNG et al., 2002). Linfócitos T CD8⁺ reativos a *Leishmania* têm sido associados à cura em pacientes com leishmaniose cutânea (DA CRUZ et al., 1994). Diferentes autores têm demonstrado a importância da ativação de linfócitos T CD8⁺ na geração de uma resposta imune protetora contra *Leishmania* (DA CRUZ et al., 1994; BASU et al., 2007b). Além desta ativação, a imunidade contra patógenos intracelulares é dependente da geração de células T CD8⁺ de memória, o que pode prover uma proteção efetiva por longos períodos de tempo (HUSTER et al., 2006).

Baseados nestes fatos, muitos autores têm utilizado a via intradérmica para o desenvolvimento de vacinas (BELKAID et al., 1998; MÉNDEZ et al., 2002; DONDJH

et al., 2005). Diferentes antígenos têm sido testados e a eficiência da via intradérmica de imunização tem sido comprovada e revisada (BABIUK et al., 2000; HUNSAKER et al., 2001; IVORY & CHADEE, 2004; BAROUCH et al., 2004; CAMPOS-NETO, 2005; Dumonteil, 2007). Proteção contra a leishmaniose visceral tem sido demonstrada em diferentes modelos (DONDI et al., 2005; MORENO et al., 2007). Comparando a via subcutânea com a via intradérmica em camundongos utilizando *L. major*, foi demonstrado que os animais que foram imunizados intradermicamente com plasmídeos de DNA apresentaram maiores índices de proteção que aqueles imunizados subcutaneamente. Os autores concluíram que a imunização era otimizada quando os plasmídeos eram inoculados intradermicamente. Além do mais, eles mostraram a capacidade dos plasmídeos de DNA em induzir a resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ e que os dois tipos de populações são requeridos para uma proteção completa (MÉNDEZ et al., 2002). No entanto, diferentes autores têm alcançado alguma forma de proteção quando a via subcutânea de imunização foi utilizada (AGUILAR-BE et al., 2005; IBORRA et al., 2005; COLER et al., 2007; GIUNCHETTI et al., 2007). A imunização de cães pela via subcutânea foi capaz de proteger cães imunizados com plasmídeos expressando LACK. Esta proteção foi correlacionada com uma forte resposta do tipo Th1 (RAMOS et al., 2007). Neste contexto, a eletroporação também tem sido associada às imunizações pelas vias intradérmica e subcutânea numa tentativa de aumentar a potência das imunizações realizadas com plasmídeos (HIRAO et al., 2007; TSANG et al., 2007).

Na tentativa de alcançar uma resposta protetora ideal, diferentes tentativas utilizando diversas rotas de administração de plasmídeos de DNA têm sido testadas. A imunização com plasmídeos de DNA pela via parenteral e pelas mucosas já vem sendo estudada há mais de quinze anos (FYNAN et al., 1993). A possibilidade de utilização destas em ampla escala vem sendo defendida por alguns autores (MCCLUSKIE & DAVIS, 1999). Utilizando a via nasal de imunização, Gomes e colaboradores, 2007, conseguiram demonstrar proteção contra a leishmaniose visceral murina com aumento da produção de IFN- γ e IL-4 com concomitante redução da produção de IL-10 em camundongos imunizados com plasmídeos expressando LACK. Da mesma forma, a imunização de camundongos com seqüências de DNA imunoestimulatórias encapsuladas em lipossomos foi capaz de elicitar uma proteção quase completa contra *L. donovani* em animais imunizados pela via intraperitoneal (MAZUMBER et al., 2007). A administração de plasmídeos pela via intraperitoneal pode ser efetiva devido

ao grande número de células apresentadoras de antígenos na cavidade peritoneal, bem como ao elevado número de linfonodos presentes nesta região. O grande contato com estas estruturas e as células nela presente pode estar facilitando o desenvolvimento de respostas imunes protetoras (HATORI et al., 2006).

Muitos autores utilizam a via intramuscular de imunização em seus modelos experimentais. A administração por esta via é fácil e segura. Os plasmídeos de DNA podem ser administrados ressuspensos em solução salina ou com a injeção de toxinas ou anestésicos para causar a necrose e regeneração do músculo injetado (OLIVEIRA et al., 1999). Estes procedimentos amplificam a resposta imune. Entretanto, ainda não está bem estabelecido se este aumento da resposta é mediado pelo aumento da expressão do antígeno pelas células musculares em regeneração ou pela captação e expressão do gene de interesse pelas células apresentadoras de antígeno recrutadas pelo tecido lesado (OLIVEIRA et al., 1999). A imunização pela via intramuscular pode induzir respostas imunes humoral e celular com forte ativação de células T CD8⁺ associada a um aumento da produção de IFN- γ (SALDARRIAGA et al., 2006; CARTER et al., 2007). Em diferentes modelos animais e utilizando diversos antígenos, a via de imunização intramuscular mostrou ser capaz de induzir a geração de respostas imunes protetoras com patógenos intracelulares, como, por exemplo, vírus e *Leishmania* (BASU et al., 2005; SALDARRIAGA et al., 2006; HU et al., 2007). Utilizando cães como modelo experimental, foi demonstrado que a utilização de plasmídeos codificantes para múltiplas proteínas de *Leishmania* foi capaz de induzir respostas diferentes quando os plasmídeos eram administrados pela via intradérmica ou intramuscular (SALDARRIAGA et al., 2006). A via intramuscular foi capaz de induzir maior estimulação de células mononucleares do sangue periférico, bem como estimular a produção de níveis mais elevados de IFN- γ nos cães imunizados.

Apesar de chamar a atenção pela importância dos tipos celulares que entram primeiramente em contato com plasmídeos injetados por diferentes rotas, animais diferentes podem responder de forma diversa aos mesmos plasmídeos e assim induzir a comportamentos diferentes com relação a padrões de respostas imunes (BASU et al., 2005; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). Desta forma, este trabalho vem com a proposta de tentar entender melhor os mecanismos de proteção induzidos pela imunização com plasmídeos de DNA codificante para antígenos que têm se mostrado protetores contra a infecção por *Leishmania* (BASU et al., 2005; GOMES et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral acomete milhares de pessoas anualmente no Brasil. Por sua gravidade e importância em nosso meio, trabalhos na literatura têm estudado possíveis candidatos que possam ser utilizados como moléculas vacinais contra o parasita responsável por causar a doença no Novo Mundo, a *Leishmania chagasi*. Alguns trabalhos têm demonstrado que componentes salivares dos vetores flebomíneos podem ter um papel fundamental no desenvolvimento da infecção (TITUS et al., 1988). Estudos recentes mostraram que plasmídeos codificantes para a proteína salivar de *L. longipalpis* (LJM19) foram capaz de proteger hamsters contra uma infecção experimental causada por *L. chagasi* (GOMES et al., 2008). Da mesma forma, foi demonstrado que o plasmídeo codificante para a proteína KMP11 foi capaz de proteger hamsters contra o desafio letal realizado com *L. donovani*. Embora muitos estudos sejam conduzidos com antígenos isolados, provavelmente, a conjugação de diferentes antígenos imunogênicos e com potencial de induzir respostas imunes protetoras prolongadas seja uma forma mais eficiente para o desenvolvimento de uma vacina ideal. Assim, neste trabalho pretendemos avaliar se a combinação destes plasmídeos (LJM19 e KMP11) pode conferir maior proteção contra a infecção experimental com *L. chagasi* do que aquela observada com a imunização com os plasmídeos separados.

Além da multiplicidade de antígenos, a forma como eles são introduzidos no organismo e são mostrados às células do hospedeiro vertebrado pode ter um papel determinante na definição do tipo de resposta gerada. O estabelecimento da infecção está diretamente ligado às respostas iniciais do hospedeiro. Pelo fato do desenvolvimento de vacina ser uma abordagem majoritária em nosso estudo, vias diferentes de inóculo foram testadas com o objetivo de entender melhor a influência destes modos de administração de antígenos na geração de repostas imunes protetoras. Outra questão importante a se pontuar é a influência destas imunizações nas populações celulares recrutadas para os sítios parasitados e o ambiente gerado no desenvolvimento destas respostas consideradas protetoras. A derme é um sítio rico em células dendríticas e células T intraepiteliais que devem desempenhar papéis relevantes no desenvolvimento de respostas imunes contra a infecção por *Leishmania*. Da mesma forma, miócitos podem também captar plasmídeos e participar em processos importantes para a geração de células responsivas a antígenos parasitários. O maior conhecimento do microambiente envolvido após o inóculo do parasita pode, também, fornecer detalhes

importantes para o entendimento dos eventos que ocorrem após a picada do flebótomo e consequente infecção por *Leishmania*. Assim, neste trabalho pretendemos avaliar se os plasmídeos de cDNA construídos a partir de componentes salivares de *L. longipalpis*, bem como plasmídeos codificantes para proteínas do parasito podem ter efeito sinérgico na proteção experimental contra a infecção por *L. chagasi* na presença do sonicado de glândula salivar do flebótomo responsável pela transmissão deste protozoário no Novo Mundo.

3. Hipótese

A imunização com plasmídeos codificantes para LJM19 e KMP11 confere uma proteção mais eficiente contra a infecção por *Leishmania chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*, em hamster, que as respectivas imunizações com os plasmídeos administrados isoladamente.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune e a proteção conferida pela imunização com plasmídeos codificantes para a proteína salivar de *L. longipalpis* (LJM19) e a proteína de membrana de cinetoplastídeos 11 (KMP11) contra um desafio constituído de *Leishmania chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Avaliar a resposta imune inicial conferida pela imunização com plasmídeos codificantes para LJM19 e KMP11.

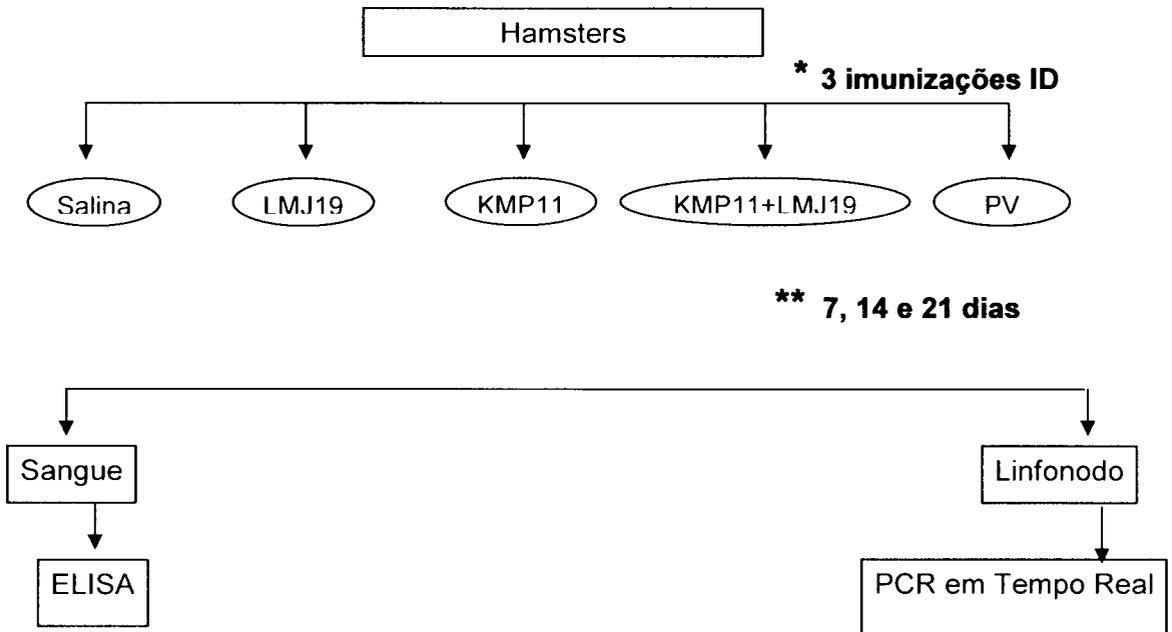
4.2.2. Avaliar a capacidade protetora e a indução de respostas imune celular e humoral geradas pelas imunizações com estes plasmídeos contra a infecção por *L. chagasi* mais SGS.

4.2.3. Avaliar a influência de vias de administração destes plasmídeos no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a infecção por *L. chagasi* mais SGS.

5. Desenho Experimental

5.1 Desenho Experimental I

Avaliação da antigenicidade de plasmídeos em hamsters.



* Imunizações com intervalos de 14 dias

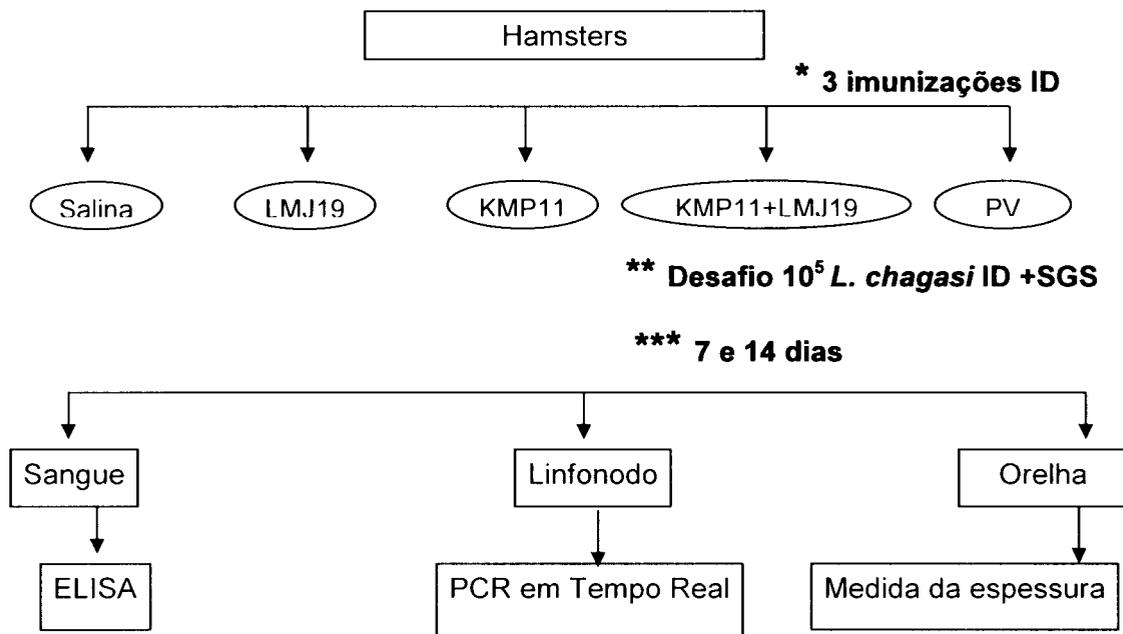
** Pontos de eutanásia dos animais

PV- Plasmídeos vazios (VR2001-TOPO e pcDNA3)

ID- Imunização Intradérmica

5.2. Desenho Experimental II

Avaliação da resposta imune inicial em hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi* mais saliva.



* Imunizações com intervalos de 14 dias

** Desafio realizado 14 dias após a última imunização

*** Pontos de eutanásia dos animais

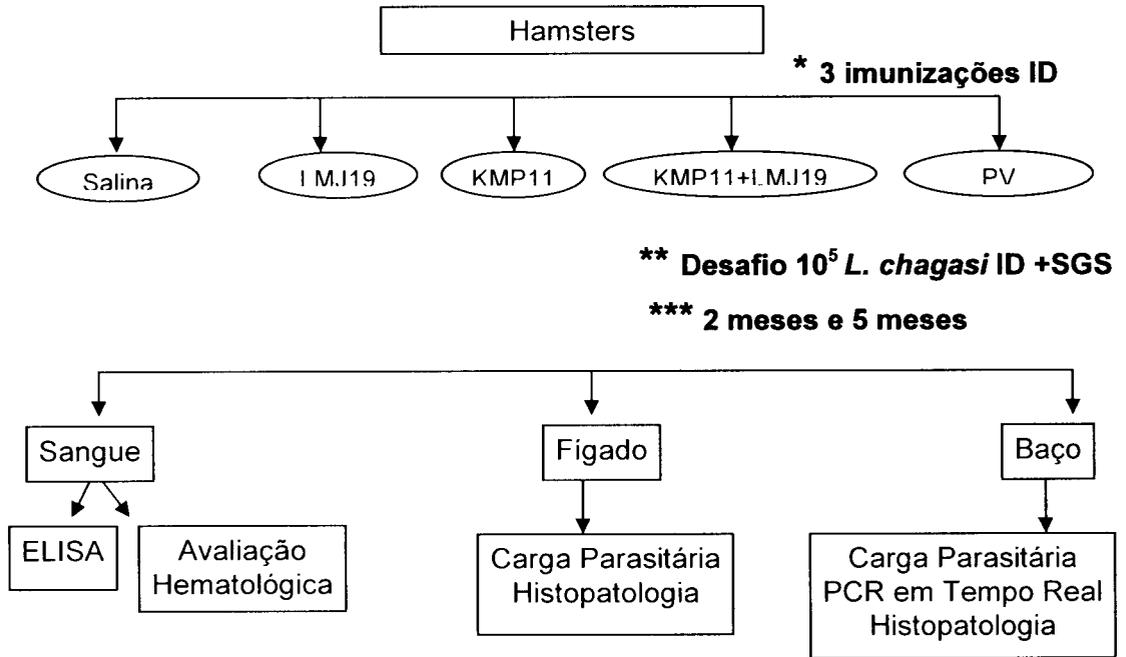
PV- Plasmídeos vazios (VR2001-TOPO e pcDNA3)

SGS- Sonicado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*

ID- Imunização pela via Intradérmica

5.3. Desenho Experimental III

Avaliação da resposta imune tardia em hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi* mais saliva.



* Imunizações com intervalos de 14 dias

** Desafio realizado 14 dias após a última imunização

*** Pontos de eutanásia dos animais

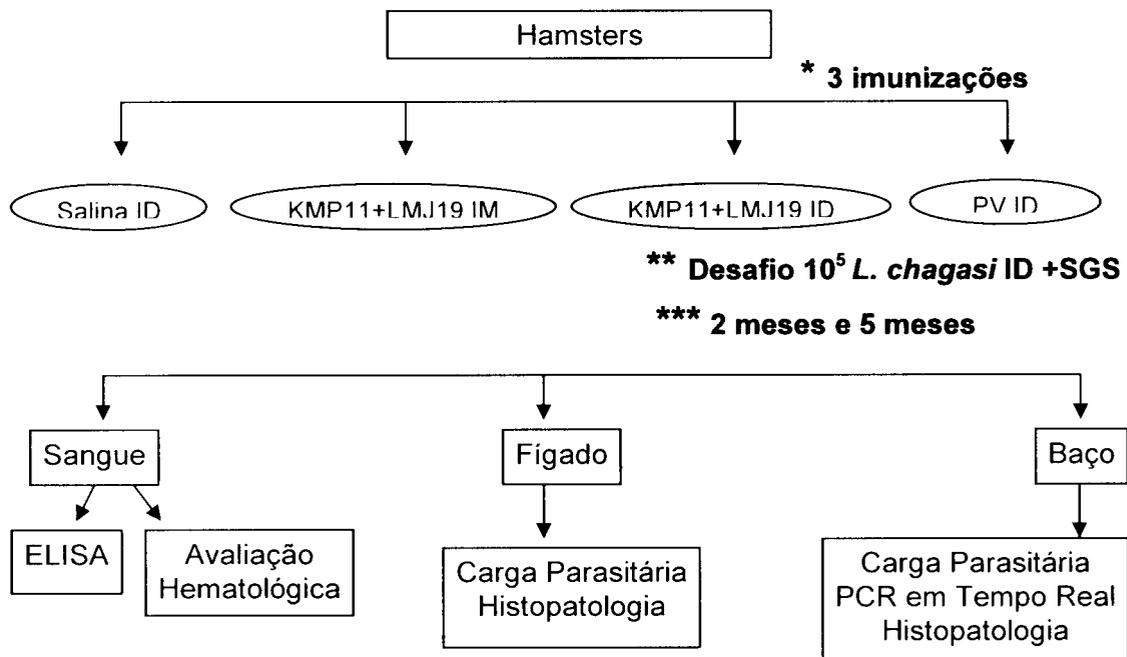
PV- Plasmídeos vazios (VR2001-TOPO e pcDNA3)

SGS- Sonicado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*

ID- Imunização Intradérmica

5.4. Desenho Experimental IV

Influência da rota de administração de antígenos na proteção contra *Leishmania chagasi*.



* Imunizações com intervalos de 14 dias

** Desafio realizado 14 dias após a última imunização

*** Pontos de eutanásia dos animais

PV- Plasmídeos vazios (VR2001-TOPO e pcDNA3)

SGS- Sonicado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*

ID- Imunização Intradérmica

IM- Imunização Intramuscular

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos com 3 meses de idade foram fornecidos pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Os animais foram manipulados e utilizados de acordo com as normas de ética da Fundação Oswaldo Cruz para Experimentação Animal (CEUA). Projeto aprovado pelo CEUA número 017/2007.

6.2. Flebótomos e obtenção do sonicado de glândula salivar (SGS)

Os flebótomos foram obtidos a partir das colônias de *Lutzomyia longipalpis* mantidas no insetário do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do CPqGM. Os insetos foram coletados em Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia. Utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, os vetores foram conduzidos ao insetário em condições controladas de luz e umidade. Hamsters anestesiados foram utilizados para alimentar os flebótomos capturados. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas foram transferidas para potes de ovipostura. As larvas foram alimentadas com ração à base de fezes de coelho após a eclosão. Os insetos adultos foram transferidos para uma gaiola e mantidos com alimentos açucarados até o momento da obtenção das glândulas salivares. Essas foram retiradas dos insetos com 5 a 7 dias após sua transformação em insetos adultos. Após extraídas, as glândulas foram colocadas em tubos eppendorfs de 1,5 ml contendo salina fosfatada (PBS), pH 7,4, e guardadas a -70 °C até o momento do uso. Para sua utilização, as glândulas foram sonicadas (20X) por 40 segundos a uma frequência de 1 Hertz e potência de 90 Watts (Branson Sonifier, Danbury, CT, USA). Com o objetivo de separar as proteínas da saliva do tecido glândular, estas foram centrifugadas a 10000 rpm por 4 minutos a 4 °C e verificada no microscópio a ausência da carcaça de glândula.

6.3. Cultura de *Leishmania chagasi*

Formas promastigotas de *L. chagasi*, (MHOM/BR00/Ba262) foram obtidas pelo cultivo em meio Schineider's (Schineider insect medium, Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), até a fase estacionária a 23°C. Os parasitas foram obtidos na fase estacionária sendo lavados três vezes com salina a 3000 rpm por 10 minutos e foram ajustados para uma concentração de 5×10^7 - 10^8 /ml.

6.4. Construção dos plasmídeos de DNA e descrição dos vetores

6.4.1. Plasmídeo codificante para LMJ19 VR2001-TOPO

A obtenção dos plasmídeos de DNA contendo as seqüências das proteínas salivares foi realizada por nosso colaborador (Dr. Jesus G. Valensuela) no National Institute of Health em Bethesda, Maryland, EUA. Os cDNAs codificando diferentes proteínas salivares foram amplificados a partir de cDNA de *Lutzomyia longipalpis* por PCR utilizando Taq polymerase (Gibco, Carlsbad, CA, USA) e oligonucleotídeos específicos. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% e imediatamente clonado no vetor de clonagem denominado VR2001-TOPO (Vical, Inc.). As células foram incubadas durante a noite a 37 °C. Oito colônias foram isoladas e misturadas com 10µl de água estéril. Cinco µl de cada amostra foram transferidos para o meio de cultura Luria com canamicina (100 µg/ml) e crescidas a 37 °C. Os outros 5 µl foram utilizados como modelo para uma reação de PCR, utilizando dois oligonucleotídeos específicos para o vetor VR2001-TOPO com a finalidade de se confirmar a presença do inserto e para a análise seqüencial. Após a visualização do produto da PCR em gel de agarose 1,1%, os dezesseis produtos de PCR foram selecionados utilizando um sequenciador de DNA CEQ2000 (Beckman Coulter). Foi escolhida a amostra que continha a seqüência que ia do N-terminal ate o códon de parada dos cDNAs das proteínas salivares do flebótomo. As células contendo o plasmídeo e carreando os genes de interesse foram cultivadas em meio Luria durante à noite a 37 °C com canamicina e a purificação do plasmídeo foi realizada utilizando um kit de isolamento de plasmídeo “mega prep endofree” (Quiagen, Germany). O plasmídeo VR2001 contém o gene resistente a canamicina, o promotor do citomegalovírus humano e o peptídeo sinal ativador do plasminogênio tecidual acima do sítio de clonagem. Após o isolamento do plasmídeo, a amostra e o plasmídeo controle (VR2001 sozinho) foram lavados 3 vezes com água ultrapura. As concentrações das amostras foram medidas por absorbância em UV.

6.4.2. pcDNA3 e Plasmídeo codificante para KMP11

Os plasmídeos codificante para a proteína de membrana de cinetoplastídeos 11 bem como a construção vazia (pcDNA3) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Manoel Sotto, da Universidad Autónoma de Madri, Espanha (FUERTES et al, 2001). Bactérias (*Escherichia coli*) competentes foram transformadas com os plasmídeos e a purificação do plasmídeo foi realizada utilizando um kit de isolamento de plasmídeo “mega prep endofree” (Quiagen, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante.

6.5. Imunizações e Infecção

Os ensaios foram realizados em hamsters divididos, à princípio, em cinco grupos experimentais. Os diferentes grupos receberam imunizações com diferentes plasmídeos obedecendo aos seguintes modelos: **Modelo 1-** I- grupo salina; II- grupo LJM19 (10 µg/animal); III-grupo KMP11 (100 µg/animal); IV- grupo KMP11 (100 µg/animal) mais LJM19 (10 µg/animal) e V-grupo recebendo plasmídeos vazios (pcDNA3 (100 µg/animal) e VR2001 (10 µg/animal)). Os animais receberam três imunizações na derme da orelha direita com intervalos de 14 dias. Os hamsters imunizados foram eutanasiados 7, 14 e 21 dias após a última imunização, sendo retirados sangue para a avaliação da produção de anticorpos e linfonodos para a investigação da produção de citocinas (Vide desenho experimental I). **Modelo 2-** Grupos semelhantes ao modelo 1. No entanto, duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 1×10^5 promastigotas de *L. chagasi* ressuspensas em salina mais o equivalente a 0.5 par sonicado de glândula salivar (SGS) de *Lutzomyia longipalpis*. O desafio foi realizado na derme da orelha esquerda. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após o desafio as espessuras das orelhas foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital. As espessuras das orelhas desafiadas foram subtraídas das espessuras das orelhas laterais para medida do desenvolvimento de reação de hipersensibilidade. Os animais foram eutanasiados 7 e 14 dias após o desafio. As orelhas infectadas foram coletadas para a mensuração das cargas parasitárias e os linfonodos drenantes da orelha infectadas (retromandibulares) foram coletados para a mensuração das cargas parasitárias (Vide desenho experimental II). **Modelo 3-** Grupos semelhantes ao modelo 1. No entanto, duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 1×10^5 promastigotas de *L. chagasi* ressuspensas em salina mais o equivalente a 0.5 par sonicado de glândula salivar (SGS) de *Lutzomyia longipalpis*. O desafio foi realizado na derme da orelha esquerda e os animais foram sacrificados 2 meses e 5 meses após o desafio. Amostras de sangue foram coletadas para a realização de análises hematológicas e sorológicas, baço para a mensuração das cargas parasitárias, produção de citocinas e avaliação histopatológica (Vide desenho experimental III). **Modelo 4-** Neste modelo, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com grupos recebendo imunizações por via diferentes. Foram utilizadas as via intradérmica (ID) e a via intramuscular (IM) como relatado a seguir: I- grupo salina via administrada pela via ID; II- grupo KMP11 (100 µg/animal) mais LJM19 (10 µg/animal) administrados pela via IM; III- grupo KMP11(100 µg/animal) mais LJM19 (10 µg/animal) administrados

pela via ID e IV- recebendo plasmídeos vazios (pcDNA3 (100 µg/animal) e VR2001 (10 µg/animal)) administrada pela via ID. A administração intramuscular dos plasmídeos foi realizada no quadríceps da perna. Duas semanas após a última imunização os animais foram desafiados na derme da orelha esquerda e os animais foram eutanasiados 2 e 5 meses após o desafio. Amostras de sangue foram coletadas para a realização de análises hematológicas e sorológicas, baço e fígado para a mensuração das cargas parasitárias, produção de citocinas e avaliação histopatológica (Vide desenho experimental IV).

6.6. Avaliação da Carga Parasitária

A carga parasitária do baço, fígado, linfonodos e orelhas foi quantificada utilizando a técnica de diluição limitante descrita previamente (TITUS et al., 1991) e a quantificação parasitária foi estimada utilizando-se o programa ELIDA (LIMA et al., 1997). Baço, fígado, linfonodos e orelhas foram coletados após a eutanásia dos animais. Estes foram homogeneizados em uma placa de Petri contendo 2 ml de meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA). Os homogeneizados foram diluídos de maneira seriada com uma diluição inicial de 1:5 à 1:1000 em meio Schneider suplementado com 100 U de penicilina por ml, 100µg/ml de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco, Carlsbad, CA, USA) em placas de 96 poços contendo meio sólido NNN ágar-sangue. Seis replicações foram feitas para cada diluição. As placas foram analisadas em microscópio invertido para verificação do aparecimento de formas promastigotas de *L. (L) chagasi*, a partir do terceiro até o décimo dia de cultura. Neste período, as placas foram incubadas numa estufa a 23 °C.

6.7. Dosagem de IgG total anti-*Leishmania*

As placas foram sensibilizadas com 10µg/ml de antígeno de *Leishmania* durante a noite a uma temperatura de 4 °C. Após três lavagens com PBS Tween 0.05%, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0.1% mais 1% de albumina sérica bovina (BSA), durante 2 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens, os soros diluídos (1/50) foram colocados na placa sensibilizada e esta foi incubada durante a noite a 4 °C. Em seguida, após três lavagens o segundo anticorpo foi adicionado (Anti-IgG total hamster) conjugado a enzima fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) numa diluição de 1/1000 sendo a placa encubada por 1 hora a 37 °C. O substrato paranitrofenilfosfato foi utilizado para revelar a placa diluído numa

concentração de 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). A reação foi parada com NaOH 3 M e a leitura foi realizada utilizando o comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro.

6.8. ELISA para detecção de IgG anti-SGS de *L. longipalpis*

Placas de 96 poços foram sensibilizadas (75 µl/poço) com SGS (1 par/ml) durante a noite a uma temperatura de 4 °C. Após três lavagens com PBS Tween 0.05% a placa foi bloqueada com PBS Tween 0.05% contendo 3% de BSA (250 µl/poço). Após o bloqueio as amostras de soro (1/50) foram adicionadas aos poços (100 µl/poço) e incubadas durante a noite a 4 °C. Após o novo ciclo de lavagens, foi adicionado o anticorpo IgG anti-hamster (100 µl/poço) conjugado a fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) numa diluição de 1/1000 sendo a placa incubada por 1 hora. O substrato paranitrofenilfosfato foi utilizado, para revelar a placa, diluído numa concentração de 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). A reação foi interrompida com NaOH 3 M e a leitura foi feita utilizando o comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro.

6.9. Histopatologia

Baço e fígados dos animais foram coletados após os tempos pré-definidos nos pontos de eutanásia dos animais e foram imediatamente fixados numa solução de formol à 10%. Após serem processados e hidratados, os órgãos foram embebidos em parafina e cortados (5µm) em micrótomo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina sendo avaliadas por microscopia óptica. Os diferentes grupos foram avaliados quanto ao desenvolvimento e o tipo de infiltrado inflamatório, bem como, a manutenção histológica dos órgãos avaliados.

6.10. Avaliação Hematológica

Amostras de sangue foram coletadas dos diferentes grupos para avaliação hematológica dois e cinco meses após o desafio com *L. chagasi*. As amostras foram obtidas através da secção da veia cava após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂. Quinhentos microlitros de sangue de cada animal foram coletados, heparinizados e avaliados com contador automático. Esfregaços sanguíneos foram realizados, corados com Giemsa, e a avaliação morfológica celular realizada por microscopia ótica.

Animais controles sadios foram utilizados para comparações com os animais imunizados e desafiados experimentalmente.

6.11. Extração de RNA e preparo de cDNA para detecção de citocinas

O RNA total foi extraído do baço e linfonodo dos hamsters imunizados, infectados e controles utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Baço e linfonodo foram macerados com a ajuda de homogeneizador de tecidos na presença de Trizol para a liberação de RNA. O RNA foi isolado e precipitado na presença de clorofórmio e isopropanol. Após lavagem com etanol a 70% e 100%, o RNA foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato. As concentrações e purificações foram determinadas após uma leitura em espectrofotômetro utilizando os comprimentos de ondas A260 e A280. Após a quantificação, o material foi guardado a -70 °C. A síntese de cDNA foi realizada acrescentando 2 µg de RNA a 30 µl de uma mistura contendo primers oligo (dT)12-18, 2,5 µM, dNTPs, 1 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), tampão 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM), 20U de inibidor de ribonuclease e 50U da transcriptase reversa Superscript II (Gibco, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada no termociclador a uma temperatura de 42 °C durante 50 minutos. Esta reação foi interrompida a uma temperatura de 95 °C durante 5 minutos.

6.12. PCR em Tempo Real

Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos *primers* variou de 18 a 23 bases, a temperatura de anelamento (T_m , do inglês melting temperature) de 59°-61°C e o conteúdo de GC de 40-60% e foram utilizados na concentração de 250nM. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 90 a 110pb e 75°-85°C de T_m . As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔR_n ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$), onde R_n^+ = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX em um dado

momento da reação, e Rn = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn , que é uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao Ct (*cycle threshold*) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene alvo – Ct gene referência, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra – ΔCt controle.

A especificidade dos *primers* foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantém as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*). A Tabela 1 mostra a seqüência de e as características dos *primers* utilizados.

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão gênica assume que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência é igual a 2, ou seja, 100%. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, onde E corresponde à eficiência e *slope* corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada gene estudado foi realizada uma reação com diluições seriadas de amostra de cDNA (1/5 a 1/1250) e o *primer* de interesse. Os resultados são apresentados como quantificação relativa em comparação com animais padrão sadios não imunizados.

Quadro 1. Descrição e identificação dos genes estudados, seqüência dos *primers* utilizados e características do produto de amplificação.

<i>Primer</i>	Identificação Gene Bank	Seqüência	Tm Ampli con (°C)	Tama nho ampli con (pb)
GAPD H	X02231	5'CTGACATGCCGCCCTGGAG 3'TCAGTGTAGCCCAGGATGCC	82	101
IFN- γ	M28621	5'GAAGCTCACCAAGATTCCGGT AA 3'TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT	78	91
IL-10	AF046210	5'AGACGCCTTTCTCTTGGAGCTT AT 3'GGCAACTGCAGCGCTGTC	77	102
TGF- β		5'GCTACCACGCCAACTTCTGTC 3'TGTTGGTAGAGGGCAAGG	57.3	21

6.15. Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, USA). As comparações múltiplas realizadas nos diferentes experimentos foram realizadas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) seguidos do pós-teste de Dunns onde os diferentes grupos foram avaliados comparados entre si. Os gráficos foram representados utilizando as médias dos resultados obtidos nos diferentes experimentos. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0.05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

7.1. Resposta humoral de hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19

Para avaliar a produção de anticorpos anti-*Leishmania* e anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis*, grupos de hamsters foram imunizados três vezes na derme da orelha direita, com intervalos de 14 dias entre cada imunização. Cinco grupos de hamsters foram avaliados e as avaliações repetidas em cada um dos grupos contendo 3 animais. Os animais foram alocados nos seguintes grupos: 1. Salina, 2. LJM19 (10 µg/animal) (GOMES et al., 2008), 3. KMP11 (100µg/animal) (Basu et al., 2005), 4. KMP11+LJM19 e 5. Plasmídeos vazios (VR2001-10 µg/animal + pcDNA3-100µg/animal) de acordo com o desenho experimental 1. Amostras de sangue foram coletadas 7, 14 e 21 dias após a última imunização. A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. Nestes experimentos foram utilizados como controle normal amostras de soro de 40 hamsters normais não imunizados. Os grupos de animais imunizados com KMP11 e KMP11 mais LJM19 mostraram uma produção crescente de anticorpos anti-*Leishmania* nos tempos avaliados. Títulos maiores de anticorpos foram demonstrados 21 dias após a última imunização. Comparados com animais controles não imunizados, hamsters imunizados com KMP11 ou KMP11 mais LJM19 mostram títulos maiores de anticorpos três semanas após a última imunização ($p<0.001$ e $p<0.001$, respectivamente). Quando a área sob a curva da progressão da produção de anticorpos anti-*Leishmania* foi comparada entre os diferentes grupos, foi observada uma área maior no grupo de animais imunizados com KMP11 mais LJM19 (**Figuras 2A e 2B**). Esta área foi significativamente maior que as áreas observadas nos grupos salina e plasmídeos vazios ($p<0.05$ e $p<0.05$, respectivamente). No entanto, não foi observada a produção de anticorpos anti-saliva nos grupos de animais avaliados nos diferentes tempos estudados (**Figuras 3A e 3B**). A área sob a curva da progressão da produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* não mostrou diferenças estatisticamente significante entre os diferentes grupos avaliados. Os experimentos foram repetidos com o mesmo número de animais para confirmação dos dados.

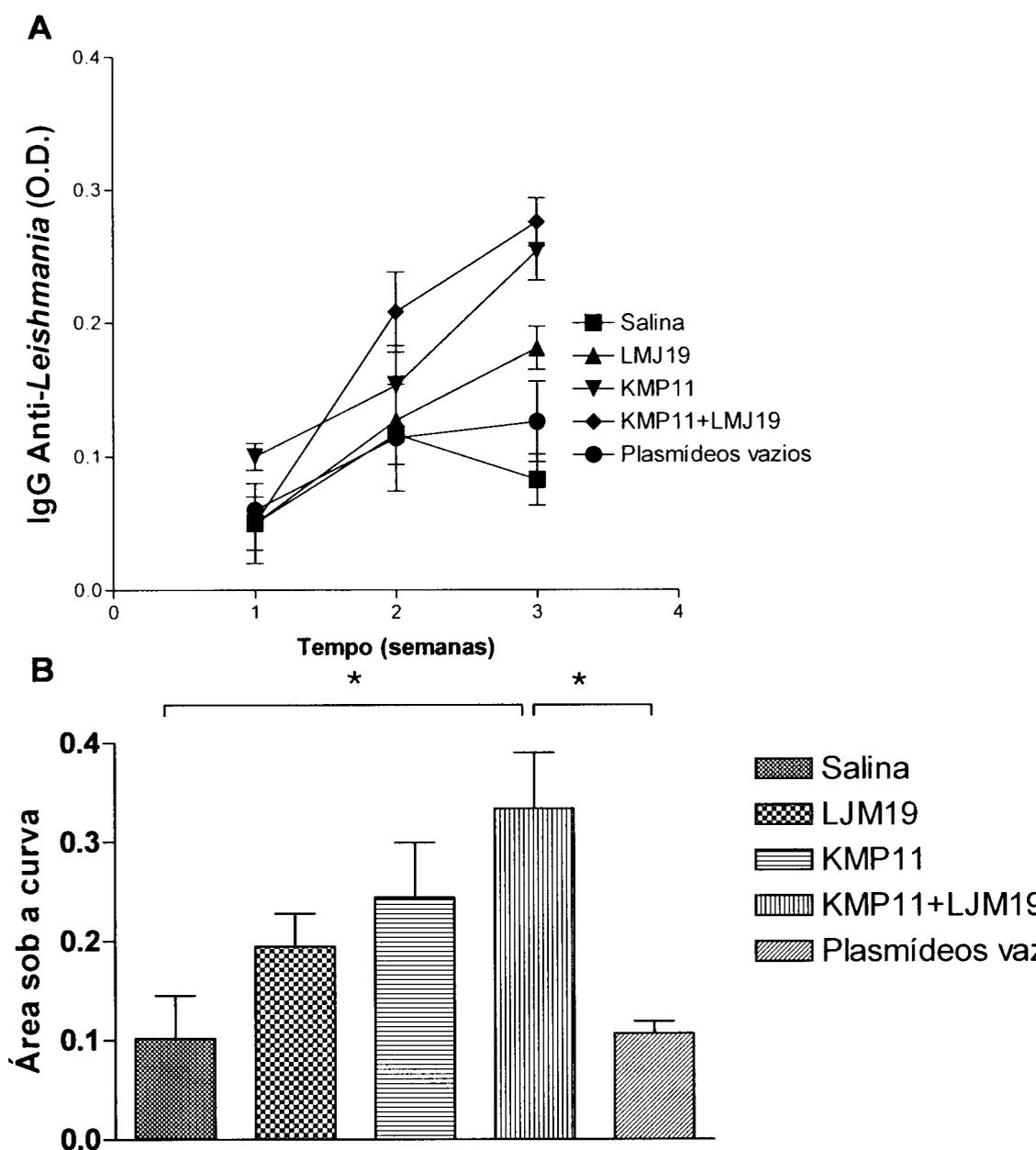


Figura 2. Produção de anticorpos anti-*Leishmania* por hamsters com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19. Os animais foram imunizados 3 vezes com intervalo de 14 dias na derme da orelha. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO). A avaliação da produção de anticorpos foi realizada por ELISA 7, 14 e 21 dias após a última imunização. As placas foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *Leishmania* e avaliadas por espectrofotometria. (A). Curva de produção de anticorpos anti-*Leishmania* em hamsters imunizados. (B) Área sob a curva. n=6. *p<0.05.

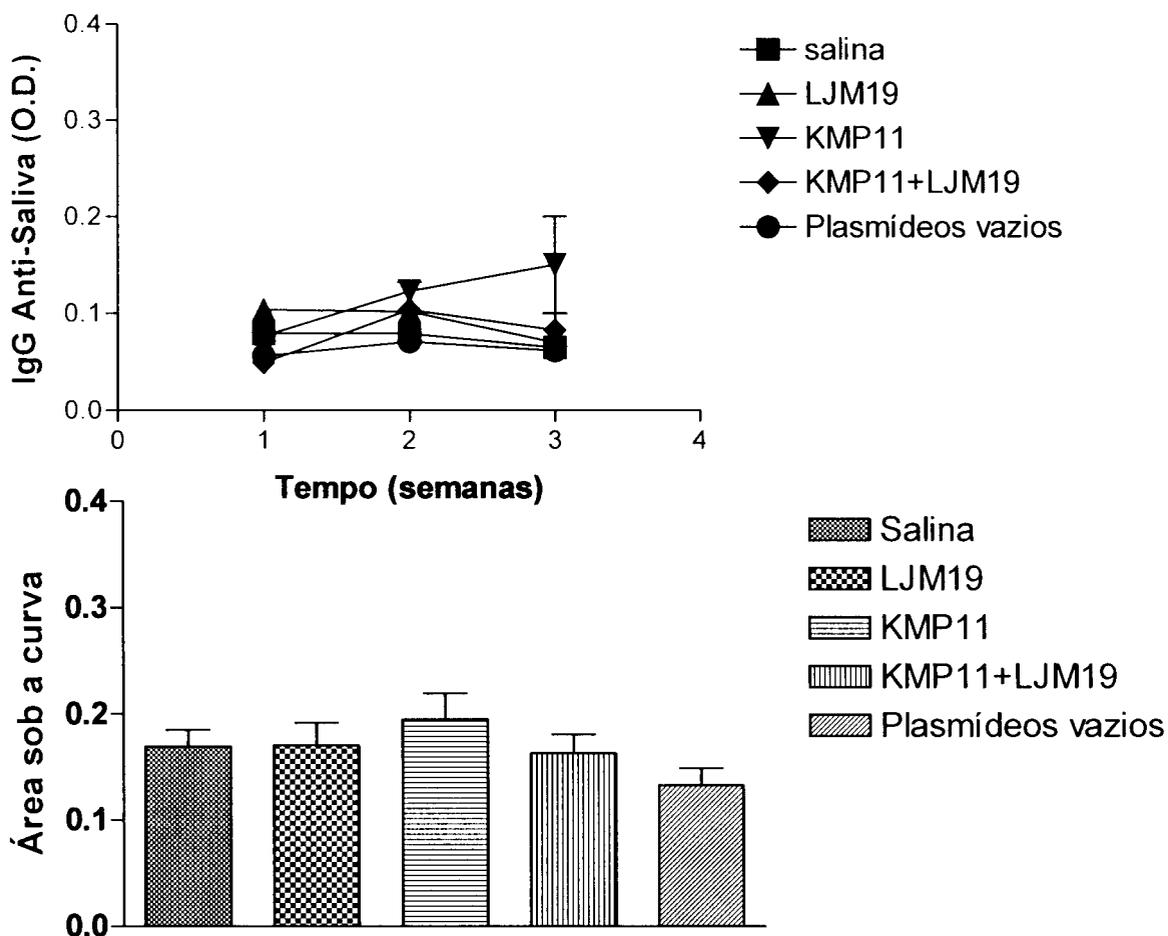


Figura 3. Produção de anticorpos anti-saliva por hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19. Os animais foram imunizados intradermicamente na orelha 3 vezes com intervalo de 14 dias. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO). A avaliação da produção de anticorpos foi realizada por ELISA 7, 14 e 21 dias após a última imunização. As placas foram sensibilizadas com SGS de *L. longipalpis* e avaliadas por espectrofotometria. (A). Curva de produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* em hamsters imunizados. (B) Área sob a curva. n=6

7.2. Avaliação da produção de IFN- γ no linfonodo drenante de hamsters imunizados

Com o objetivo de avaliar a produção de interferon- γ nos linfonodos drenantes das orelhas imunizadas, grupos de hamsters foram imunizados três vezes na derme da orelha direita, com intervalos de 14 dias entre cada imunização. Cinco grupos de animais foram imunizados de acordo com o desenho experimental I. Linfonodos retromandibulares foram coletados 7, 14 e 21 dias após a terceira imunização. A produção de IFN- γ foi avaliada por PCR em tempo real utilizando a quantificação relativa comparando a produção de citocinas dos hamsters imunizados com produção de animais normais controle. Todos os grupos de animais imunizados com plasmídeos codificantes para LJM19, KMP11 ou KMP11 mais LJM19 apresentaram produção relativa de IFN- γ quando comparados aos controles padrões. Os diferentes grupos mostraram cinéticas variadas de produção desta citocina pró-inflamatória. Animais imunizados com LJM19 apresentaram maior produção desta citocina 14 dias após a última imunização. Embora não estatisticamente significativa, neste tempo os animais deste grupo produziram 10 vezes mais interferon- γ que os animais controle. Hamsters imunizados com KMP11 mostraram maior produção de IFN- γ 21 dias após a terceira imunização. Esta produção foi significativamente maior que os grupos salina e plasmídeos vazios ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente). No entanto, os animais que receberam KMP11 mais LJM19 tiveram maior produção de gama interferon 14 dias após a última imunização (**Figura 4**). Esta produção se mostrou significativamente maior que a produção dos animais que receberam plasmídeos vazios ($p < 0.05$).

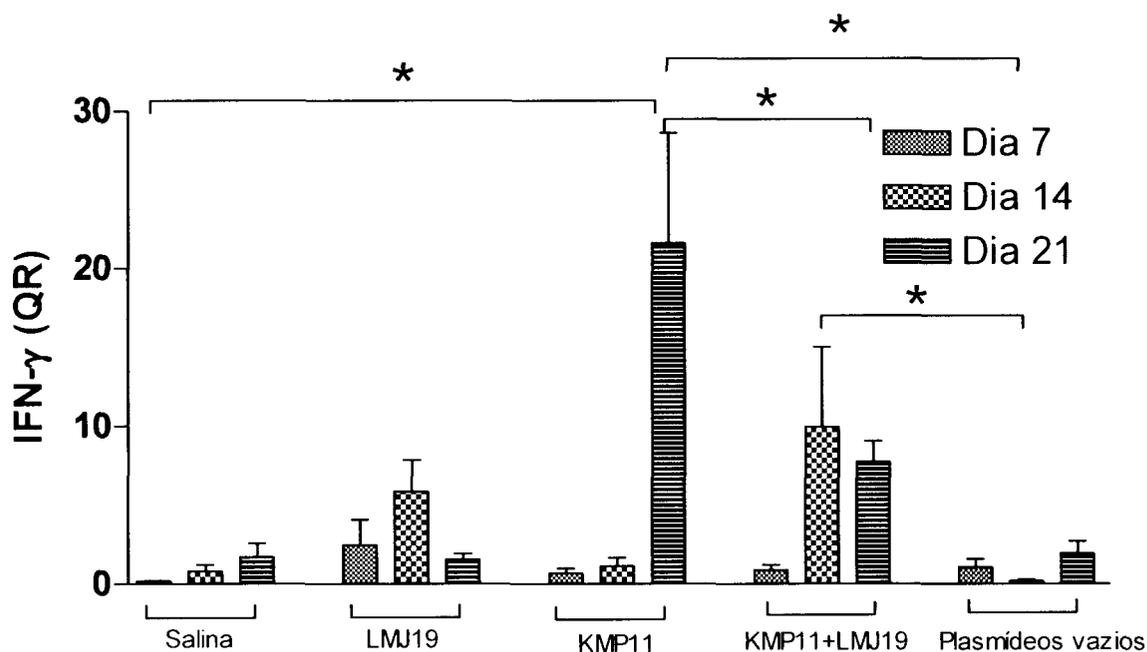


Figura 4. Expressão de IFN- γ em linfonodos drenantes de hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 e/ou LJM19. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes. Os hamsters sofreram eutanásia 7, 14 e 21 dias após a última imunização. Os linfonodos retromandibulares foram coletados, macerados em trizol e a produção de IFN- γ foi avaliada por PCR em tempo real utilizando como medida a quantificação relativa (QR) utilizando como controle hamsters não infectados. n=6. *p<0.05.

7.3. Resposta imune celular em hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*

Com o objetivo de medir uma resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) grupos de hamsters foram imunizados três vezes na derme da orelha direita, com intervalos de quatorze dias entre cada imunização. Cinco grupos experimentais com três animais foram formados de acordo com o desenho experimental II. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. chagasi* mais saliva de *L. longipalpis* quatorze dias após a última imunização na orelha esquerda. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após a infecção as espessuras das orelhas dos animais foram medidas com paquímetro digital. Os animais imunizados com KMP11 e KMP11 mais LJM19 apresentaram DTH quarenta e oito horas após o desafio quando comparados com os animais do grupo salina (**Figura 5**).

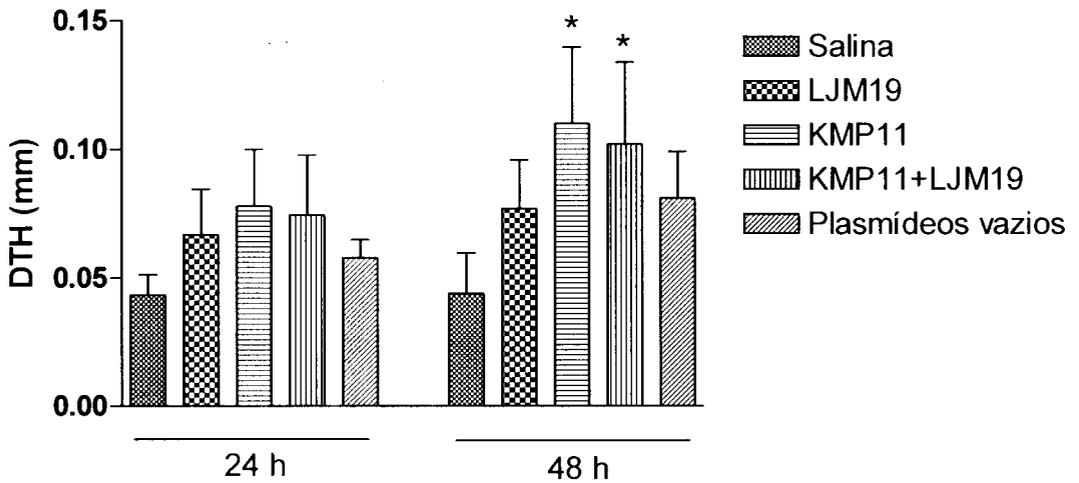


Figura 5. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) em hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após o desafio a espessura das orelhas desafiadas foram medidas com paquímetro digital e subtraídas da espessura da orelha lateral. n=9. *p<0.05.

7.4. Carga Parasitária nos linfonodos e orelha em tempos iniciais após a infecção por *L. chagasi*: Resposta humoral nos primeiros momentos após o desafio

Com o objetivo de avaliar as cargas parasitárias na orelha e nos linfonodos drenantes da área onde ocorreu o desafio com parasitas, animais foram imunizados e desafiados seguindo o modelo apresentado no desenho experimental II. Hamsters foram imunizados três vezes intradermicamente na orelha direita com intervalos de quatorze dias e duas semanas após a última imunização foram desafiados na orelha lateral com 10^5 formas promastigotas de *L. chagasi* mais saliva de *L. longipalpis*. Sete e quatorze dias após o desafio os animais sofreram eutanásia sendo orelha onde se fez o desafio e os respectivos linfonodos drenantes da área removidos e as cargas parasitárias avaliadas por diluição limitante.

Com exceção dos animais imunizados com LJM19, os demais grupos de hamsters imunizados com KMP11 ou KMP11 mais LJM19 apresentaram cargas parasitárias menores na orelha sete dias após o desafio ($p < 0.01$ em relação ao grupo salina e $p < 0.05$ em relação ao grupo imunizado com plasmídeos vazios) (**Figura 6A**). Entretanto, apenas o grupo imunizado com KMP11 mais LJM19 mantém proteção significativa em relação aos grupos controles ($p < 0.05$) quatorze dias após a infecção. Ao avaliar as cargas parasitárias nos linfonodos drenantes, não foram observadas diferenças significantes entre os diferentes grupos estudados (**Figura 6B**) sete ou quatorze dias após a o desafio.

Os diversos grupos não mostraram diferenças significantes quanto à produção de anticorpos anti-saliva nos tempos avaliados (**Figura 7A**). O mesmo padrão de resposta humoral foi observado quanto à produção de anticorpos anti-*Leishmania*. Nos diferentes tempos avaliados não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados (**Figura 7B**).

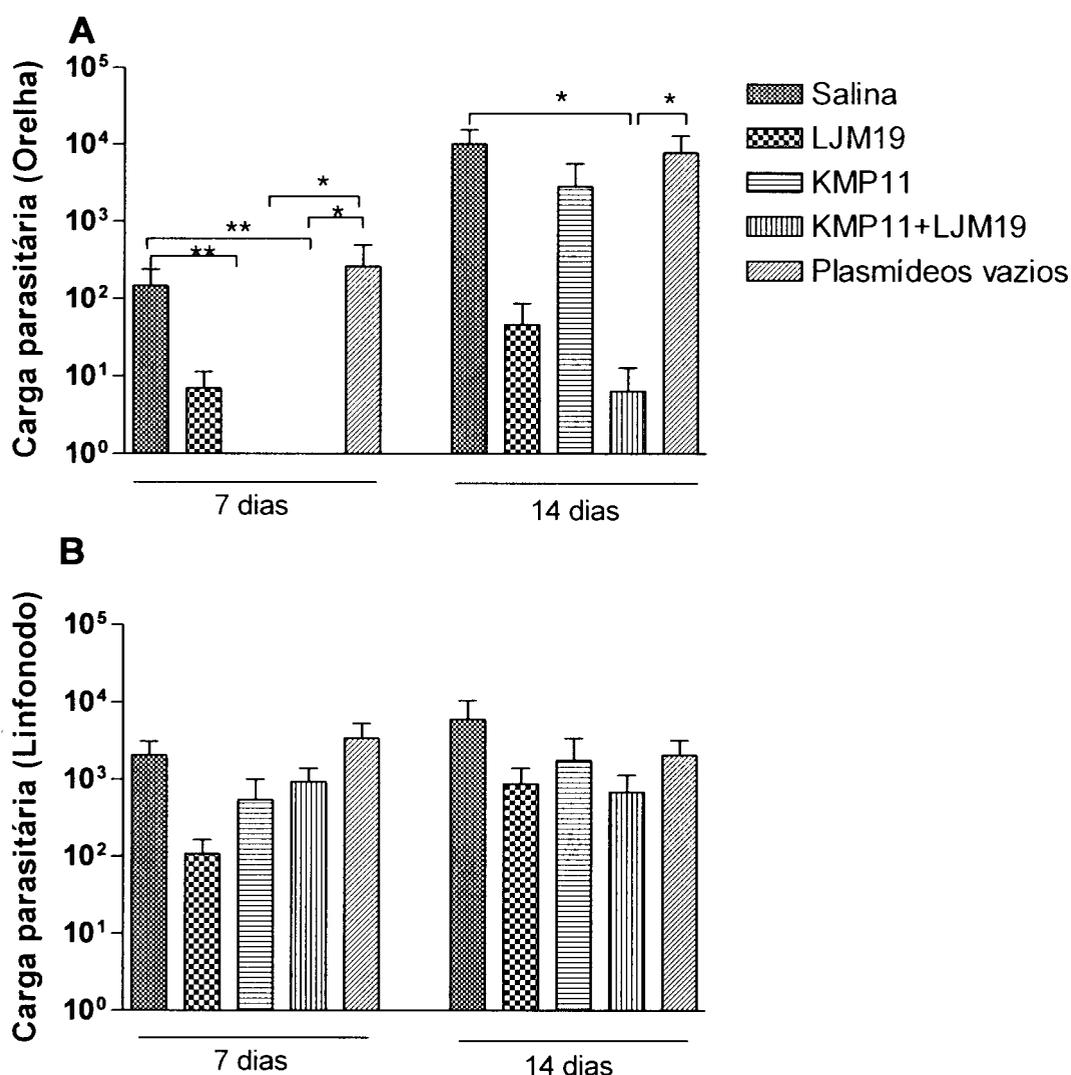


Figura 6. Cargas parasitárias nos linfonodos e orelhas em tempos iniciais da infecção experimental de hamsters com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de 14 dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Sete e quatorze dias após o desafio os animais sofreram eutanásia. Os linfonodos drenantes e as orelhas foram coletados e a cargas parasitárias avaliadas por diluição limitante (ELIDA). (A) Carga parasitária na orelha. (B) Carga parasitária no linfonodo drenante. n=6. *p<0.05, **p<0.01.

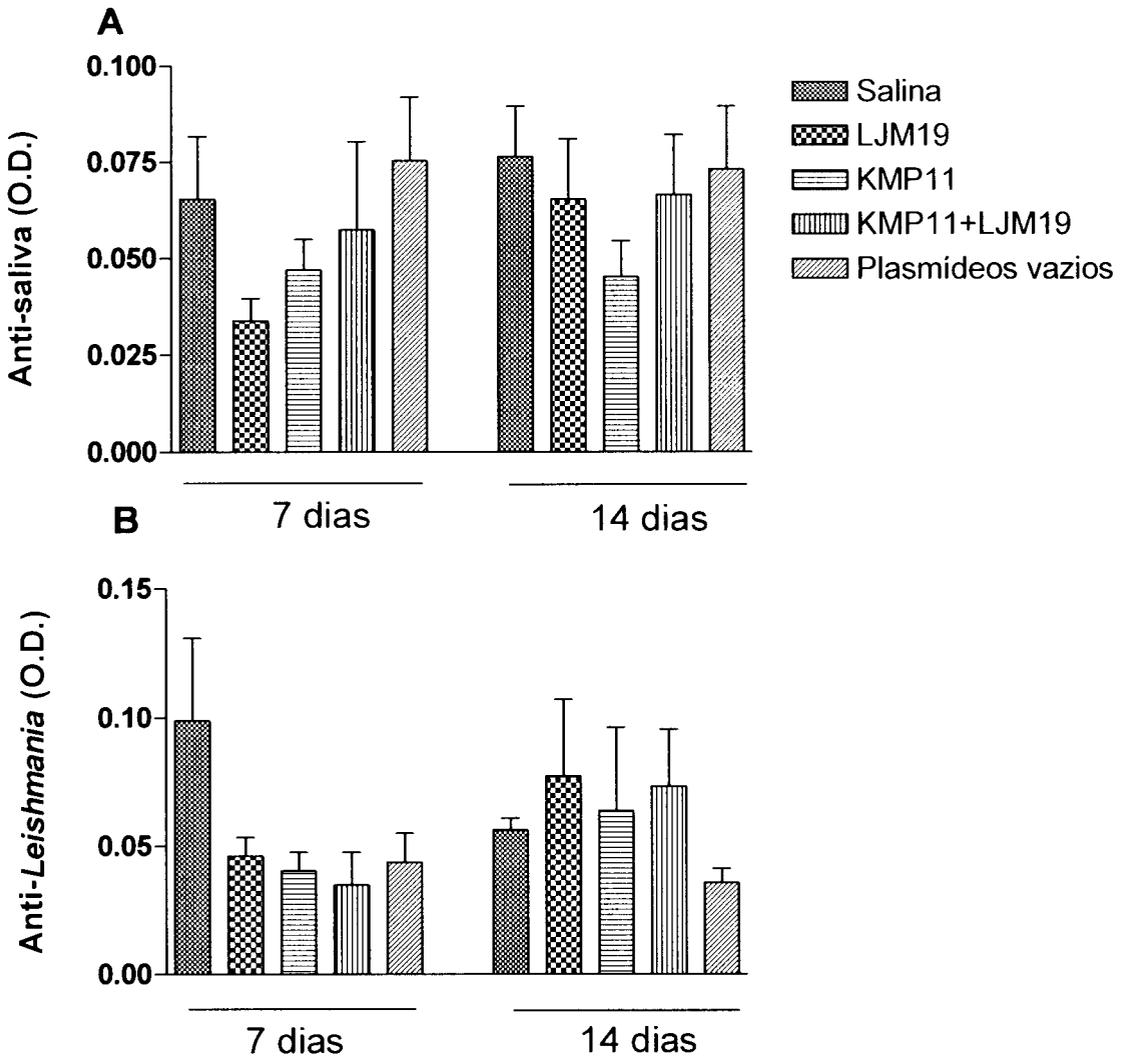


Figura 7. Produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters infectados com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de 14 dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Sete e quatorze dias após o desafio os animais sofreram eutanásia. Sete e quatorze dias após o desafio os animais foram eutanasiados e amostras de sangue coletadas. A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. As placas foram sensibilizadas com SGS de *L. longipalpis* ou com antígeno solúvel de *Leishmania* e avaliadas por espectrofotometria. (A) Produção de IgG total anti-saliva de *L. longipalpis*. (B) Produção de IgG total anti-*Leishmania*. n=6

7.5. Expressão de citocinas no linfonodo drenante em tempos iniciais pós-infecção com *L. chagasi*

Com o objetivo de medir a produção de citocinas nos linfonodos drenantes das orelhas que foram desafiadas grupos de hamsters forma imunizados três vezes na derme da orelha direita, com intervalos de quatorze dias entre cada imunização. Cinco grupos experimentais com seis animais foram formados de acordo com o desenho experimental II. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigostas de *L. chagasi* quatorze dias após a última imunização na orelha esquerda. Sete e quatorze dias após o desafio os animais foram eutanasiados, os linfonodos drenantes retromandibulares foram coletados e a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real.

Sete dias após o desafio os animais do grupo LJM19 apresentam uma elevada relação $IFN\gamma/IL-10$ bem como uma relação $IFN\gamma/TGF-\beta$ nos linfonodos. A primeira relação se mostra estatisticamente significativa em relação ao grupo dos animais imunizados com plasmídeos vazios ($p < 0.05$) (**Figura 8A**) enquanto a segunda se mostrou significativamente maior em relação aos grupos salina e ao grupo de animais imunizados com plasmídeos vazios ($p < 0.05$) (**Figura 8B**). Os animais dos grupos KMP11 e KMP11 mais LJM19 apresentaram também maiores relações entre $IFN\gamma/IL-10$ e $IFN\gamma/TGF-\beta$ sete dias após o desafio. No entanto, estas não se mostraram significativamente maiores que os grupos controles (**Figuras 8A e 8B**). Quatorze dias após o desafio os grupos imunizados com KMP11 ou KMP11 mais LJM19 apresentaram relações ente $IFN\gamma/IL-10$ e $IFN\gamma/TGF-\beta$ 2.5 vezes maior que os grupos controles, mesmo não sendo encontrada a significância estatística (**Figuras 8A e 8B**).

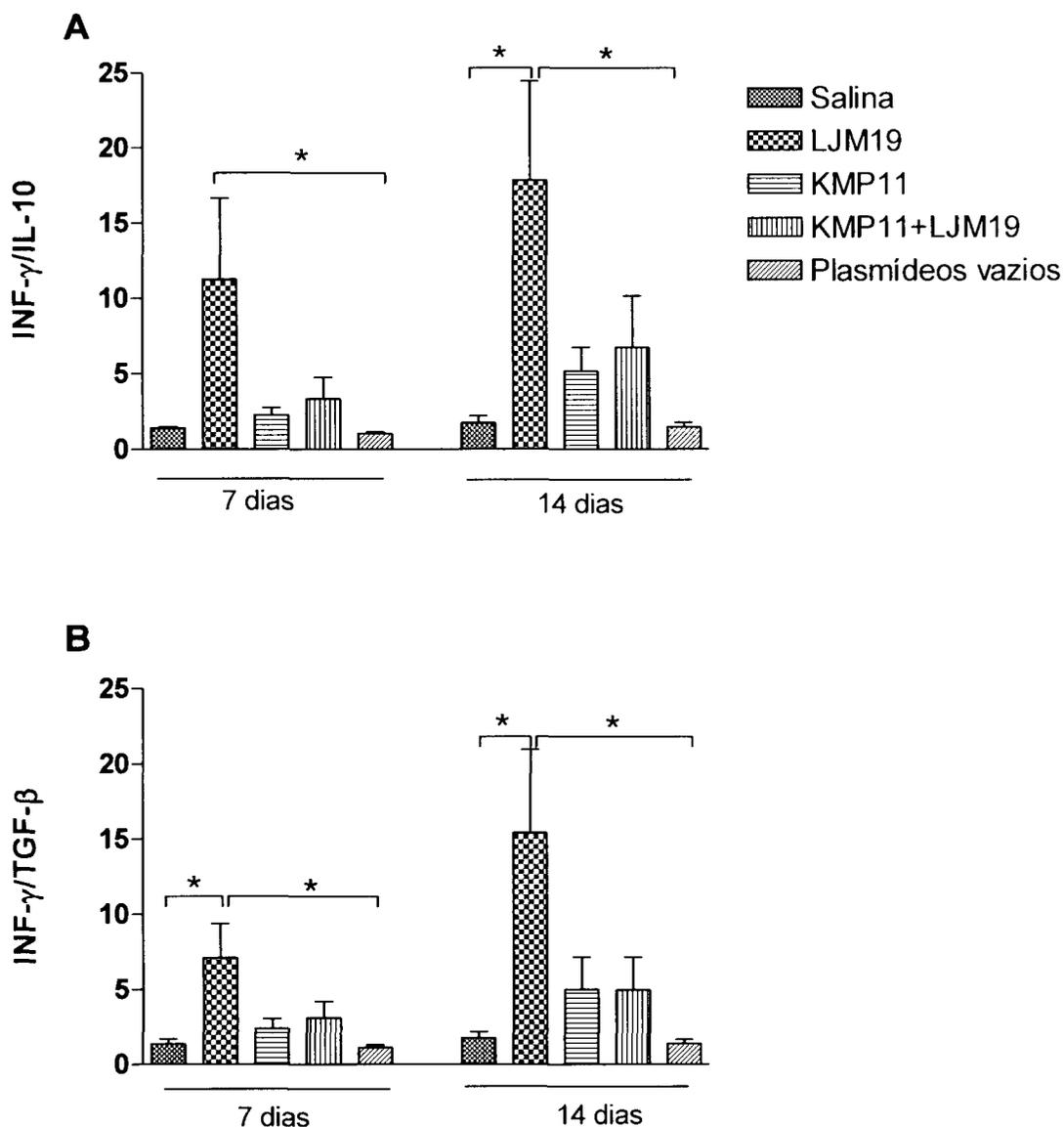


Figura 8. Expressão de citocinas em linfonodo drenante de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Sete e quatorze dias após o desafio os animais sofreram eutanásia. Os linfonodos drenantes foram coletados, macerados em trizol e a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real utilizando como medida a quantificação relativa (QR) utilizando como controle hamsters não infectados. n=6. *p<0.05.

7.6. Avaliação da carga parasitária em hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com *L. chagasi*

Para avaliar se as imunizações com plasmídeos codificantes para LJM19 e/ou plasmídeo codificante para KMP11 eram capazes de conferir proteção contra o desafio contra formas promastigotas de *L. chagasi* mais saliva de *L. longipalpis*, cinco grupos experimentais com três animais foram formados de acordo com desenho experimental III. Os animais foram imunizados três vezes intradermicamente na orelha direita com intervalos de 14 dias e duas semanas após a última imunização foram desafiados na orelha lateral com 10^5 formas promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio os animais foram sacrificados sendo baço e fígado coletados, pesados e a carga parasitária avaliada por diluição limitante.

O peso dos diferentes órgãos não mostrou diferenças estatisticamente significante quando avaliados dois meses após o desafio, no entanto, cinco meses após o desafio o baço dos animais de animais imunizados com KMP11+LJM19 se mostrou menor que os do grupo imunizado com plasmídeos vazios. Não foram observadas diferenças estatisticamente significante nos pesos dos fígados cinco meses após o desafio. Os diferentes grupos de animais imunizados com LJM19, KMP11 ou KMP11 mais LJM19 mostraram ter cargas parasitárias menores que os grupos controles dois meses após a infecção no baço (**Figura 9A**) e no fígado (**Figura 9B**), onde foram consideradas diferenças estatisticamente significante quando $p < 0.05$. Cinco meses após o desafio os animais imunizados com LJM19 bem como os animais imunizados com LJM19 mais KMP11 ainda mostram cargas parasitárias significativamente menores que os grupos de animais controles tanto no baço ($p < 0.01$ e $p < 0.01$, respectivamente) como no fígado ($p < 0.05$) (**Figuras 9A e 9B**).

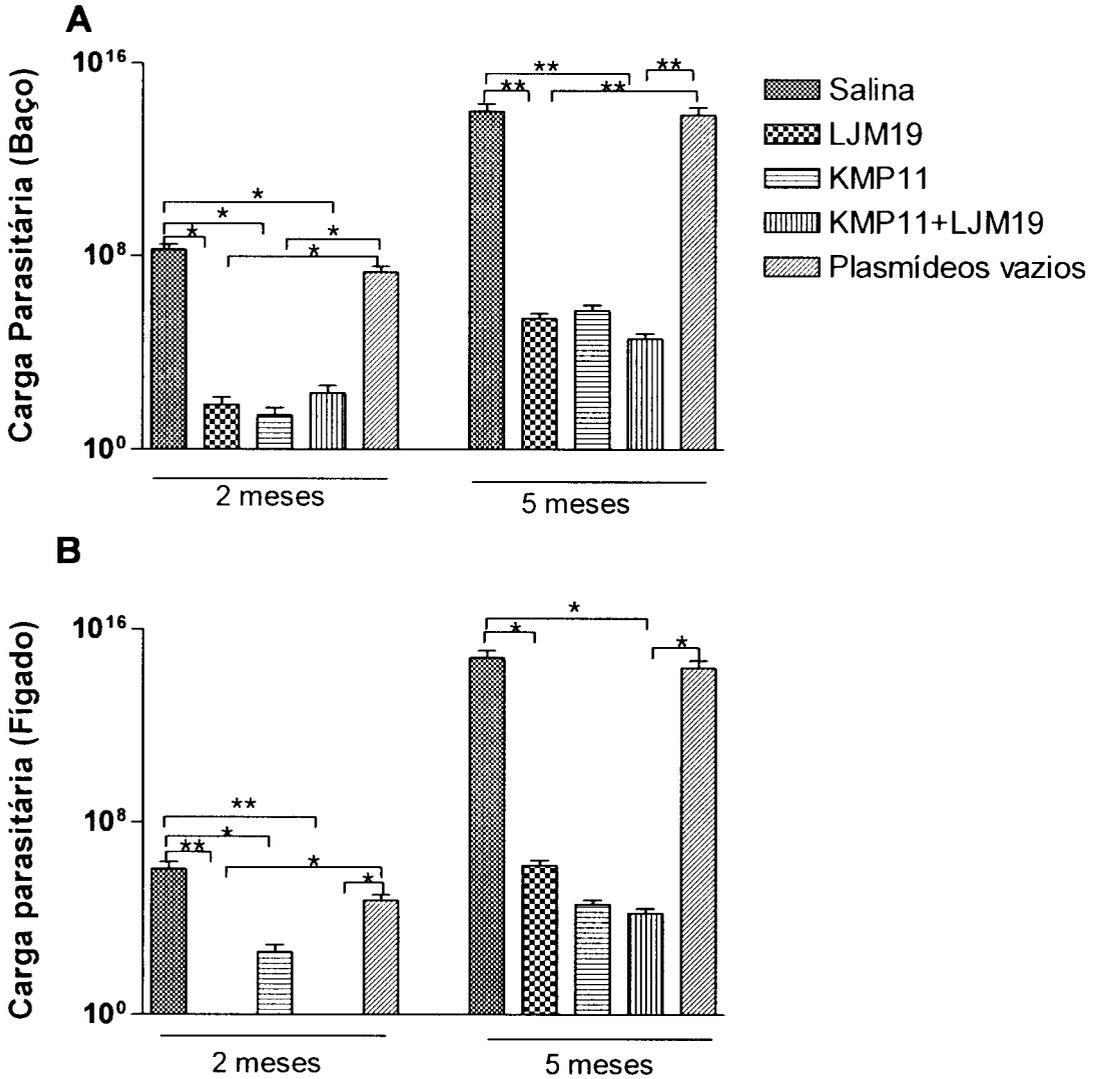


Figura 9. Cargas parasitárias esplênicas e hepáticas de hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio os baços e os fígados dos animais foram coletados e pesados. As cargas parasitárias foram avaliadas por diluição limitante (ELIDA). (A). Cargas parasitárias no baço. (B). Cargas parasitárias no fígado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n=8$

7.7. Resposta humoral de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com *L. chagasi*

Para avaliar a produção de anticorpos anti-*Leishmania* e anticorpos anti-saliva, grupos de hamsters foram imunizados três vezes na derme da orelha direita, com intervalos de 14 dias entre cada imunização. Cinco grupos experimentais, com três animais cada, foram formados de acordo com o modelo experimental III. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. chagasi* mais sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. longipalpis* quatorze dias após a última imunização na orelha esquerda. Amostras de sangue foram coletadas dois e cinco meses após desafio. A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA.

Os animais dos diferentes grupos avaliados não apresentaram diferenças estatísticas na produção de anticorpos anti-saliva dois meses após o desafio ($p>0.05$) (**Figura 10A**). Apesar do grupo imunizado com LJM19 apresentar maior produção de IgG total anti-saliva esta não se mostrou estatisticamente significante nem dois nem cinco meses após o desafio (**Figura 10A**). Embora não tenham mostrado diferenças quanto a produção de anticorpos anti-*Leishmania* dois meses após o desafio, os animais imunizados com os dois plasmídeos codificantes para antígenos mostraram uma redução da produção de IgG total anti-*Leishmania* em relação aos animais dos grupos controles ($p<0.05$) (**Figura 10B**).

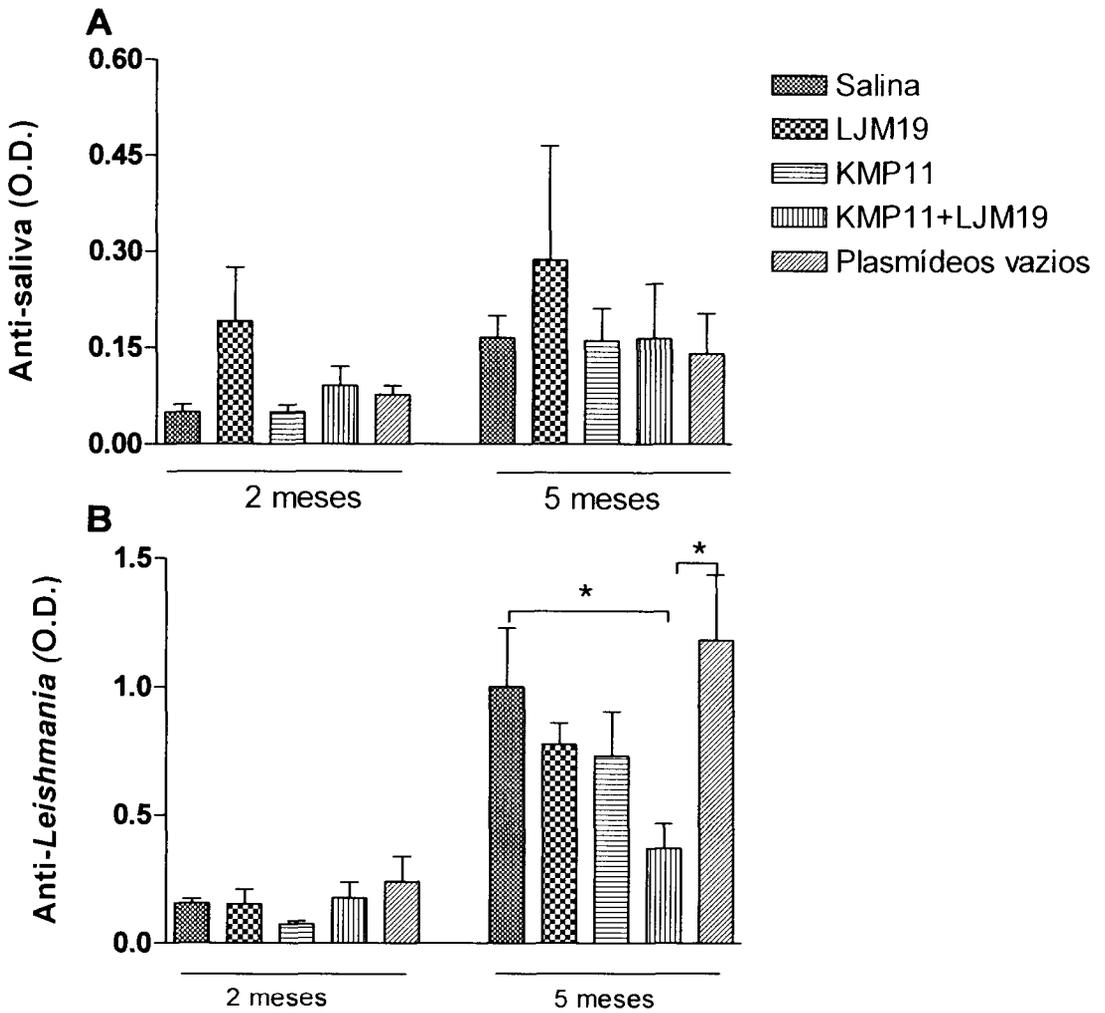


Figura 10. Produção de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LIM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio amostras de sangue foram coletadas e a produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. As placas foram sensibilizadas com SGS de *L. longipalpis* ou com antígeno solúvel de *Leishmania* e avaliadas por espectrofotometria. (A). Produção de anticorpos anti-saliva. (B). Produção de anticorpos anti-*Leishmania*. n=8. * p<0.05.

7.8. Expressão de citocinas em baços de hamsters infectados com *L. chagasi*

Com o objetivo de avaliar a produção de citocinas produzidas no baço dos animais imunizados e desafiados grupos de hamsters foram imunizados de acordo com o desenho experimental III. Resumidamente, os animais foram imunizados três vezes intradermicamente na orelha direita com intervalos de 14 dias e duas semanas após a última imunização foram desafiados na orelha lateral com 10^5 formas promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio os animais sofreram eutanásia sendo os baços coletados. Amostras foram avaliadas para a produção de IFN- γ , IL-10 e TGF- β pela técnica de PCR em tempo real.

Animais imunizados com LJM19, KMP11 e KMP11 mais LJM19 não mostraram diferenças nas relações entre a produção de interferon- γ (IFN- γ) e IL-10 no baço dois meses após o desafio quando comparados aos grupos controles (**Figura 11A**). No entanto, estes animais mostraram maior relação entre a produção de interferon- γ e a produção de TGF- β . Entretanto, apenas o grupo imunizado com KMP11 mostrou aumento significativo desta relação dois meses após o desafio ($p < 0.05$). Quando avaliados cinco meses após o desafio os animais dos grupos controles apresentam uma alta relação IFN- γ /IL-10 bem como uma relação IFN- γ /TGF- β aumentada no baço. Os animais imunizados com plasmídeo codificante para LJM19 mostraram uma relação IFN- γ /IL-10 significativa menor que os animais controles ($p < 0.01$). Os grupos imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 ou com os plasmídeos dados em conjunto também mostraram uma relação IFN- γ /IL-10 diminuída no baço cinco meses após o desafio ($p < 0.05$) (**Figura 11A**). Quando a relação IFN- γ /TGF- β foi avaliada os animais imunizados com plasmídeo codificante para LJM19 e imunizados com os dois plasmídeos mostraram relações menores que as produzidas pelos animais do grupo salina ($p < 0.01$) (**Figura 11B**).

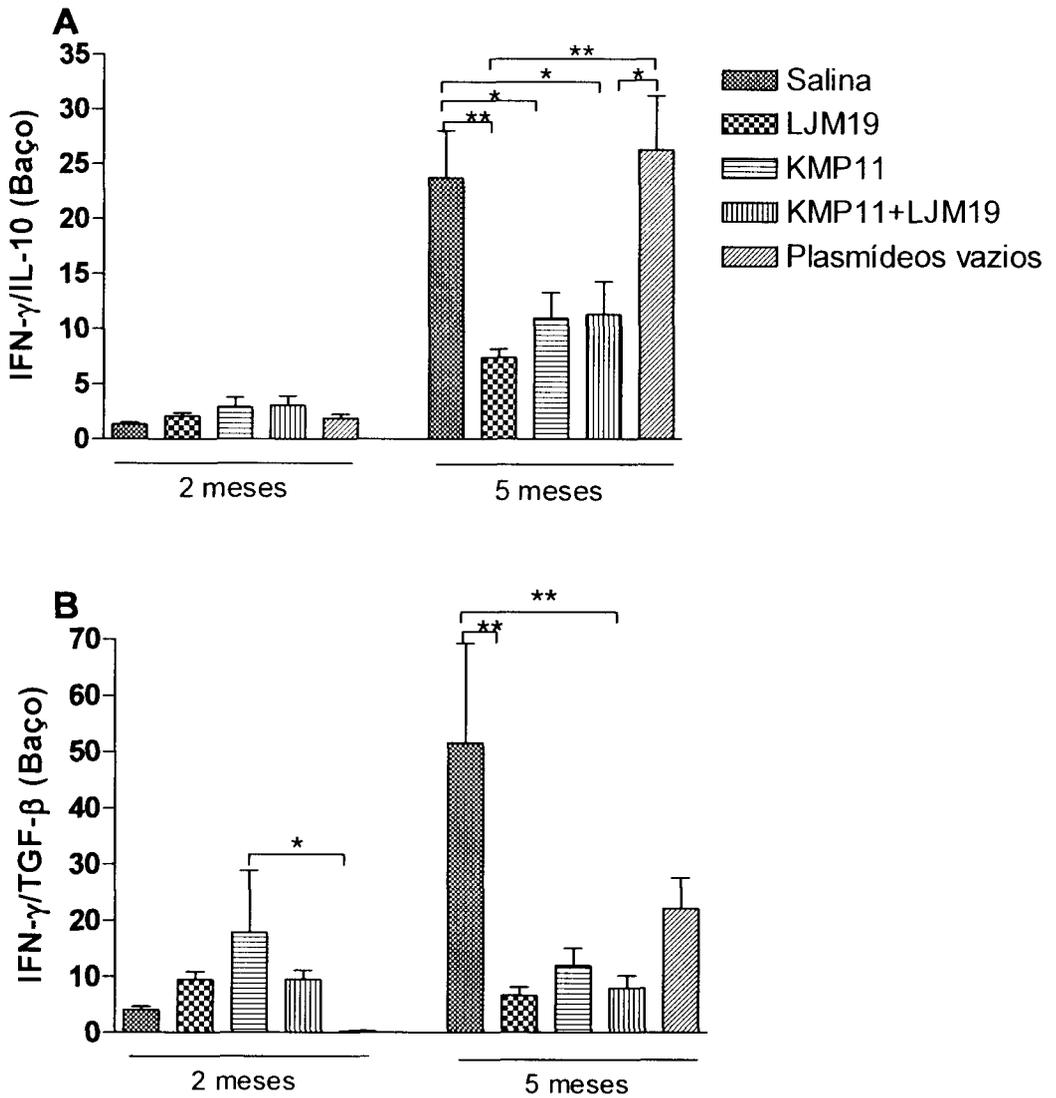
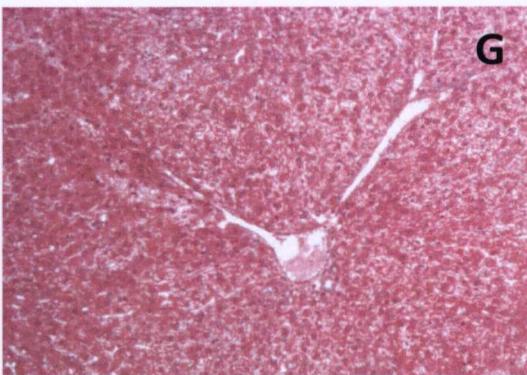
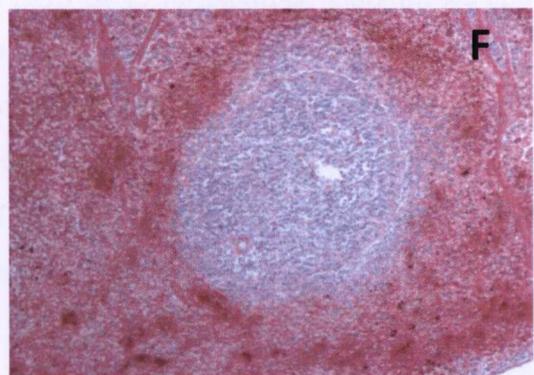
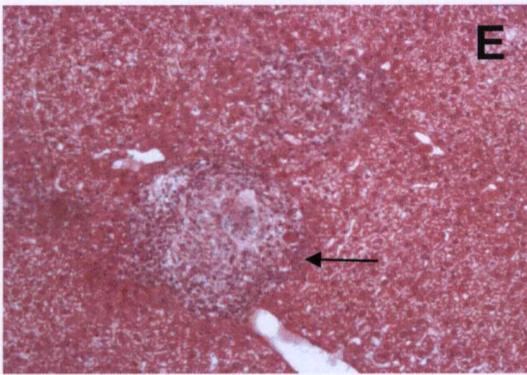
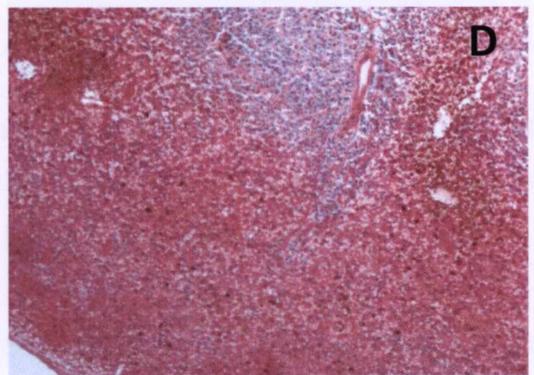
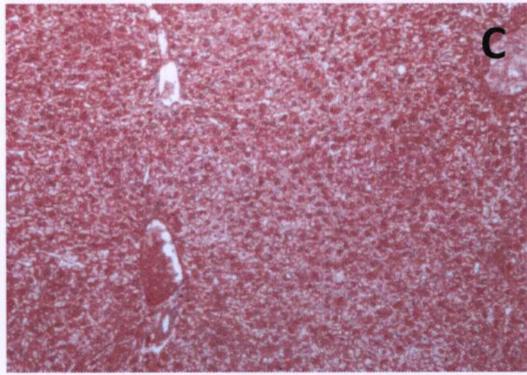
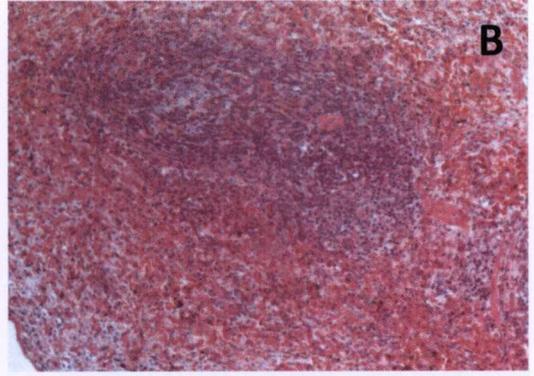
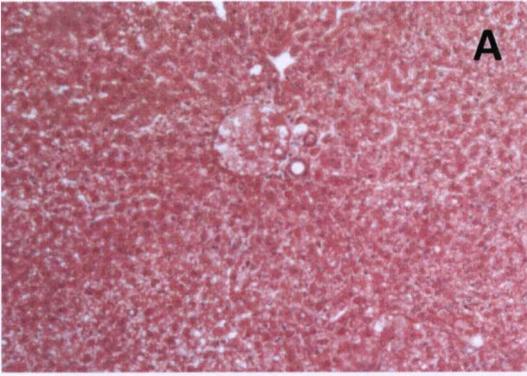


Figura 11. Expressão de citocinas no baço de animais imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio amostras do baço foram coletadas e a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real utilizando como medida a quantificação relativa (QR) utilizando como controle hamsters não infectados. n=8. *p<0.05, **p<0.01.

7.9. Avaliação histopatológica hepática e esplênica de hamsters imunizados e desafiados com *L. chagasi*

Com o objetivo de avaliar as alterações histológicas hepáticas e esplênicas causadas pela infecção com *L. chagasi* em hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para LJM19, KMP11 ou KMP11mais LJM19, animais foram de acordo com o desenho experimental III. Dois e cinco meses após o desafio os animais foram eutanasiados sendo baço e fígado coletados. Amostras foram fixadas, processadas, coradas por HE e avaliadas por microscopia óptica.

Dois meses após o desafio os animais dos diferentes grupos não mostram alterações hepáticas marcantes, contudo o grupo de animais imunizados com KMP11 mostrou a presença de granulomas hepáticos com a presença de numerosas células mononucleares (**Figura 12**). No baço, alguns animais já começam a mostrar de forma discreta alterações na morfologia da polpa branca com perda dos contornos dos centros germinativos dois meses após a infecção nos grupos controles (**Figura 12**). Com a progressão da doença alterações mais marcantes são observadas. Cinco meses após a infecção os animais dos grupos controle (salina e plasmídeos vazios) mostram intenso infiltrado inflamatório difuso e com bastante células distribuídas pelos espaços porta. Nos grupos de animais imunizados foi observada a presença de granulomas bem distribuídos com a presença de numerosas células mononucleares. A inflamação difusa nestes animais se mostrou com menor intensidade e a morfologia hepática se mostra mais preservada (**Figura 13**). No baço, os animais controles mostram uma hipoplasia acentuada da polpa branca, congestão e periesplenite. Os animais dos grupos imunizados mostram uma maior conservação da estrutura esplênica, com polpa branca melhor estruturada e hipoplasia discreta (**Figura 13**).



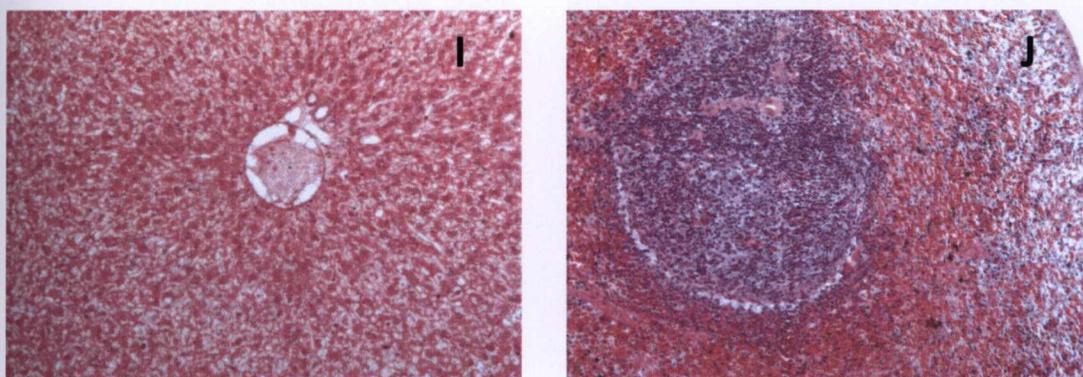
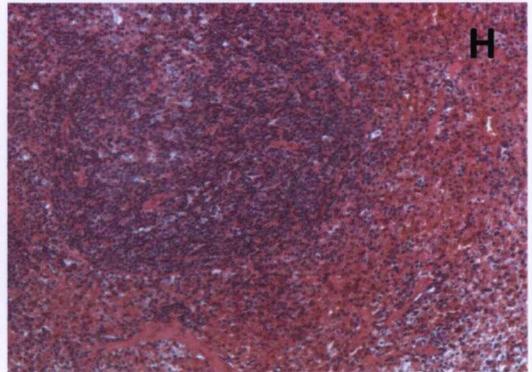
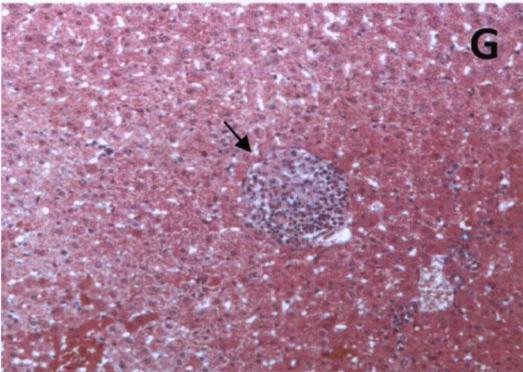
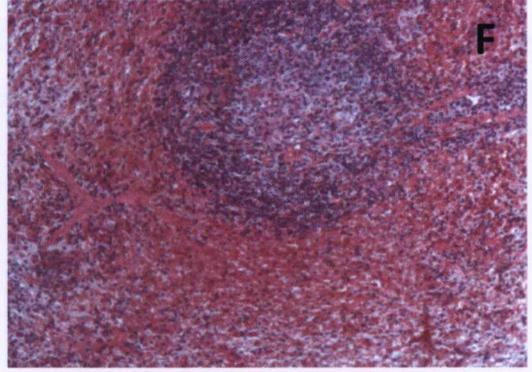
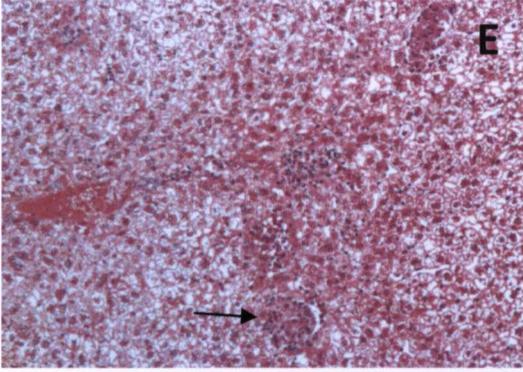
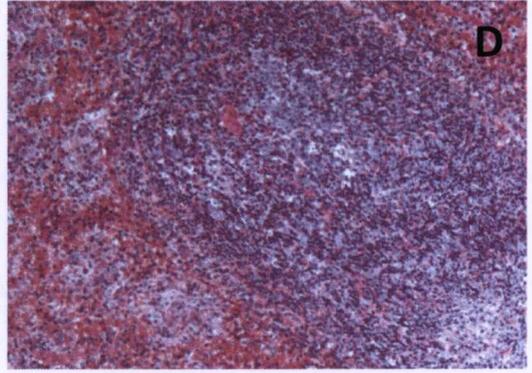
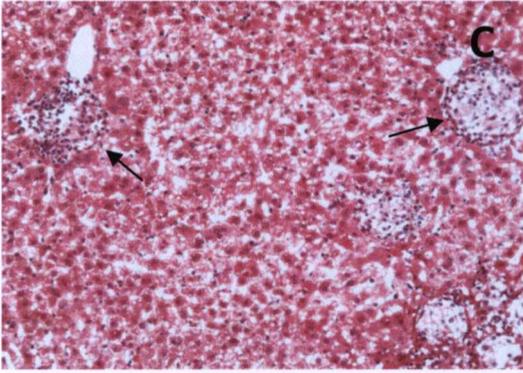
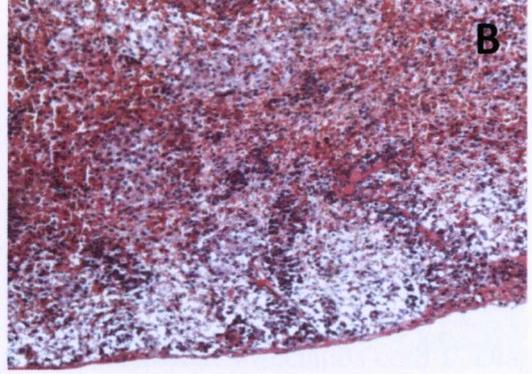
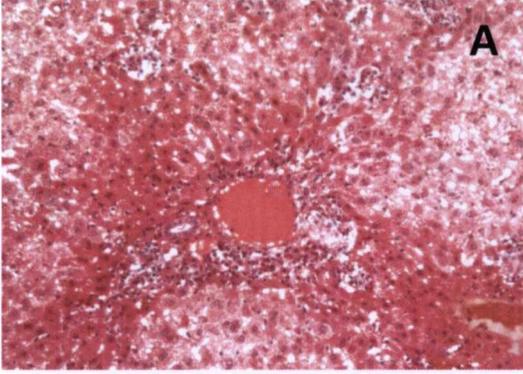


Figura 12. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses após o desafio amostras do fígado foram coletadas fixadas e coradas por H&E e avaliadas por microscopia ótica. Micrografias do fígado (A) Salina, (C) LJM19, (E) KMP11, (G) KMP11 mais LJM19, (I) Plasmídeos vazios. Micrografias do Baço (B) Salina, (D) LJM19, (F) KMP11, (H) KMP11 mais LJM19, (J) Plasmídeos vazios. As setas mostram a presença de granulomas hepáticos. Aumento 10X. n=8.



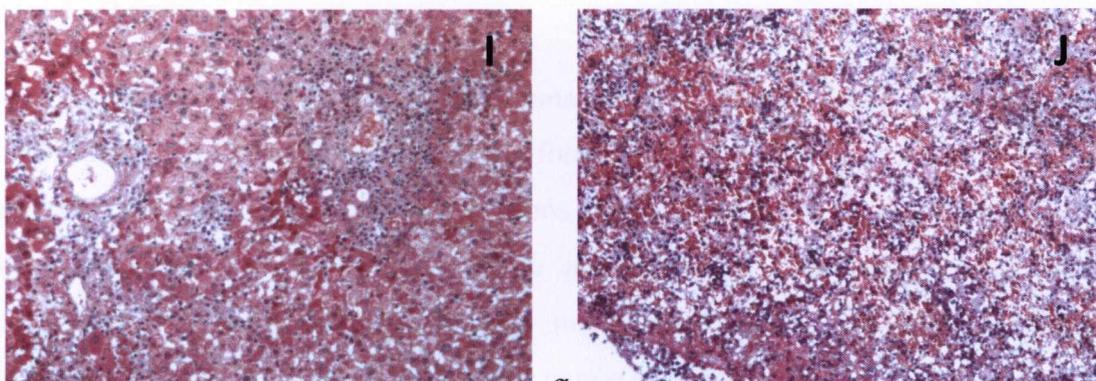


Figura 13. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Cinco meses após o desafio amostras do fígado foram coletadas fixadas e coradas por H&E e avaliadas por microscopia ótica. Micrografias do fígado (A) Salina, (C) LJM19, (E) KMP11, (G) KMP11 mais LJM19, (I) Plasmídeos vazios. Micrografias do Baço (B) Salina, (D) LJM19, (F) KMP11, (H) KMP11 mais LJM19, (J) Plasmídeos vazios. As setas mostram a presença de granulomas hepáticos. Aumento 10X. n=8.

7.10. Avaliação hematológica de hamsters imunizados com plasmídeos e desafiados com *L. chagasi*

Para avaliar as alterações hematológicas desenvolvidas pelos animais imunizados e desafiados, experimentos foram realizados de acordo com o desenho experimental III. Dois e cinco meses após o desafio os animais foram eutanasiados sendo amostras de sangue coletadas e avaliadas por contador automático e as populações celulares confirmadas por microscopia óptica. Animais sadios não infectados foram utilizados como controle para o experimento.

Dois meses após o desafio nenhum dos grupos experimentais mostrou alterações hematológicas significantes em relação aos hamsters normais usados como controle para os experimentos. Tanto na linhagem branca como na linhagem de células vermelhas do sangue não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais do grupo controle sadio. Entretanto, cinco meses após o desafio os animais do GRUPO V apresentaram, embora não de forma significante, leucopenia em relação ao grupo de animais sadios ($p > 0.05$). Os animais do grupo salina mostraram plaquetopenia em relação ao grupo de animais sadios ($p < 0.05$). No entanto, nenhum dos grupos imunizados desenvolveu alterações significantes na série branca em relação aos animais sadios (**Quadro 2**). No eritrograma foi verificado que os animais dos GRUPOS I e V desenvolveram eritropenia ($p < 0.05$), diminuição da quantidade de hemoglobina ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) e diminuição do hematócrito ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) em relação aos controles sadios. Contudo, nenhum dos grupos de animais imunizados desenvolveu alterações significantes na série vermelha de células sanguíneas em comparação aos controles sadios (**Quadro 3**).

	Normal	Salina		LJM19		KMP11		KMP11+ LJM19		Plasmídeos vazios	
	Tempo 0	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
Leucócitos (10³/μl)	10.0±0.4	10.6±1.3	8.7±3.5	13.2±0.5	6.9±0.8	12.3±1.2	7.6±0.5	10.7±1.1	10.3±0.9	10.5±1.1	6.4±0.7
Linfócitos (10³/μl)	5.5±0.4	6.5±0.6	3.8±1.5	6.9±1.0	3.7±0.5	5.9±0.7	3.2±0.4	6.5±0.4	3.6±0.4	4.4±0.6	4.2±0.4
Monócitos (10³/μl)	5.1±0.8	4.8±0.9	6.7±0.3	6.1±1.3	4.1±0.6	1.3±0.7	4.6±0.4	4.4±0.6	6.3±1.1	4.9±0.6	3.7±1.1
Neutrófilos (10³/μl)	3.3±0.3	3.3±0.6	4.1±1.9	4.9±1.0	2.5±0.8	5.8±0.5	3.8±0.5	3.6±0.8	5.4±0.6	4.6±0.8	1.7±0.3
Eosinófilos (10³/μl)	2.51±0.2	2,35±0.7	1.7±0.9	5.01±1.0	2.1±0.7	5.1±1.0	3.1±0.3	1.9±0.4	5.4±1.0	3.3±0.6	1.8±0.3
Plaquetas (10³/μl)	2.3±0.3	1.5±0.2	0.7±0.6*	1.6±0.3	2.1±0.2	1.6±0.1	3.1±0.7	1.3±0.3	1.4±0.2	2.5±0.4	1.3±0.3

Quadro 2. Leucograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10⁵ promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses e cinco meses após o desafio amostras de sangue foram coletadas e avaliadas por contador automático seguido de confirmação por microscopia óptica. As comparações estatísticas foram realizadas em comparação com o grupo de animais normais (Tempo 0). n=6. * p<0.05.

	Normal	Salina		LJM19		KMP11		KMP11+ LJM19		Plasmídeos vazios	
	Tempo 0	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
Hemácias (10⁶)	8.5±0.1	8.1±0.1	6.8±0.4*	8.4±0.2	8.4±0.2	8.2±0.1	7.7±0.4	7.8±0.2	8.5±0.3	7.8±0.2	6.9±0.4*
Hemoglobina (g%)	16.1±0.4	14.9±0.3	13.2±1.1*	16.2±0.4	14.9±0.5	16.1±0.2	14.1±0.7	14.4±0.4	15.8±0.4	14.5±0.7	13.1±0.6*
Hematócrito (%)	47.5±0.6	45.1±0.5	37.3±1.7*	45.8±1.0	47.6±1.6	46.4±0.6	47.7±2.1	43.7±1.2	47.9±1.9	43.6±1.2	37.6±2.2*
VCM (fl)	56.1±0.3	55.3±0.6	55.0±1.1	54.6±0.6	55.7±0.8	55.2±0.4	62.3±1.1	55.7±0.8	56.0±0.4	55.7±0.3	54.5±0.4
HCM (pg)	18.8±0.2	18.8±0.3	19.3±0.7	19.2±0.4	18.4±0.5	18.8±0.2	18.2±0.5	18.9±0.4	18.5±0.2	18.9±0.4	19.1±0.6
CHCM (%)	34.2±0.3	33.9±0.4	35.3±1.7	35.3±1.7	32.9±1.1	34.8±0.2	30.0±0.6	33.9±0.3	33.0±0.5	34.1±0.7	35.0±1.1

Quadro 3. Eritrograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente na orelha com salina, LJM19, KMP11, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) por três vezes intradermicamente com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10⁵ promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses e cinco meses após o desafio amostras de sangue foram coletadas e avaliadas por contador automático seguido de confirmação por microscopia óptica. As comparações estatísticas foram realizados em comparação com o grupo de animais normais (Tempo 0). n=6. * p<0.05.

7.11. Comparação de diferentes vias de administração de plasmídeos de cDNA: Determinação das cargas parasitárias e avaliação da resposta humoral de hamsters desafiados com *L. chagasi*

Com o objetivo de comparar qual a melhor via de administração de imunógenos protetores, neste caso plasmídeos de cDNA, era capaz de induzir respostas imunes mais intensas duas vias de administração destes componentes foram testadas. A via intradérmica (ID) testada nos resultados anteriores foi comparada com via intramuscular (IM). Desta forma, hamsters foram divididos de acordo com o desenho experimental IV. Duas semanas após a última imunização os animais foram desafiados na derme da orelha esquerda e os animais foram sacrificados 2 e 5 meses após o desafio. Baços e fígado foram coletados, pesados e suas cargas parasitárias determinadas por diluição limitante. A produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* e a anti-*Leishmania* foi avaliada por ELISA e a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real.

Os animais imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11 ou LJM19 independentemente da via utilizada para as imunizações apresentaram cargas parasitárias menores que os grupos controles. Dois meses após o desafio os animais imunizados apresentaram diminuição maior que cinco logaritmos nas cargas parasitárias do baço em relação aos grupos salina e plasmídeos vazios ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) (**Figura 14A**). No fígado foi observada uma diminuição maior que quatro logaritmos nas cargas parasitárias dos grupos imunizados em relação aos grupos salina e plasmídeos vazios ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) (**Figura 14B**). Cinco meses após o desafio os animais do grupo imunizado pela via intradérmica continuam a apresentar diferença estatística em relação aos grupos controles ($p < 0.05$). No entanto, o grupo de animais imunizados pela via intramuscular mostrou um aumento da carga parasitária esplênica não sendo observada diferenças estatísticas em relação aos grupos controles ($p > 0.05$) (**Figura 14A**). No fígado foi observado um comportamento semelhante ao encontrado no baço nos animais imunizados pela via intramuscular. Da mesma forma que no baço, os animais imunizados pela via intradérmica mostram diferenças estatísticas quando são comparados aos grupos controles cinco meses após o desafio ($p < 0.05$) (**Figura 14B**) sem, no entanto, serem observadas diferenças estatísticas entre as vias de imunização intradérmica e intramuscular.

Quanto a resposta humoral destes animais é avaliada, não são observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos dois meses após o desafio com relação

a produção de anticorpos anti-*Leishmania*. Contudo, o grupo de animais imunizados pela via intramuscular mostrou uma maior produção de anticorpos anti-saliva quando são comparados com os animais do grupo salina ($p < 0.05$) (**Figura 15A**). Quando a resposta humoral é avaliada cinco meses após o desafio os animais do grupo imunizado pela via intramuscular não mostram diferenças quando comparados aos grupos controles quanto à produção de anticorpos anti-saliva ($p > 0.05$) e quanto à produção de anticorpos anti-*Leishmania* ($p > 0.05$). No entanto, embora não tenham sido observadas diferenças quanto à produção de anticorpos anti-saliva, o grupo de animais imunizados pela via intradérmica mostrou diferenças significantes quanto à produção de anticorpos anti-*Leishmania* quando comparados com os grupos salina e dos plasmídeos vazios (0.05 e 0.05, respectivamente) (**Figura 15B**).

Ao estudar a produção de citocinas no baço dos animais infectados foi observado que embora não tenham sido encontradas diferenças significantes dois meses após o desafio nas relações $IFN-\gamma/IL-10$ e $IFN-\gamma/TGF-\beta$, estas foram duas vezes maiores em relações às encontradas no grupo salina (**Figuras 16A e 16B**). No grupo de animais imunizados pela via intradérmica estas relações se mostraram 5 vezes maior quando comparadas com as do grupo salina e duas vezes maior quando comparadas com as do grupo imunizado com os plasmídeos vazios. No entanto, cinco meses após o desafio não são observadas diferenças significantes entre os animais que receberam imunização via intradérmica e os animais que foram imunizados pela via intramuscular ($p < 0.05$) (**Figuras 16A e 16B**).

A análise histopatológica do fígado não mostrou alterações estruturais marcantes dois meses após o desafio nos diferentes grupos estudados (**Figura 17**). No entanto, cinco meses após o desafio os animais imunizados desenvolveram granulomas hepáticos (**Figura 18**). Da mesma forma, dois meses após o desafio os animais dos diferentes grupos apresentam os baços levemente congestionados, mas com sua estrutura geral preservada (**Figura 17**). Quando avaliados cinco meses após o desafio sinais de alterações compatíveis com a progressão da doença são observados. Os animais dos grupos controles apresentam uma hipoplasia severa com perda de grande parte da polpa branca do órgão. Os animais imunizados com plasmídeos codificantes para antígenos (KMP11 mais LJM19) apresentam baços mais preservados e com menor grau de hipoplasia. Embora congestão e leve desorganização estrutural da polpa branca também possa ser observada (**Figura 18**).

Dois meses após o desafio nenhum dos grupos experimentais mostrou alterações hematológicas significantes em relação aos hamsters normais usados como controle para os experimentos. Tanto na linhagem branca como na linhagem de células vermelhas do sangue não foram observadas diferenças estatísticas com relação aos animais encontrados nos do grupo controle sadio. Os animais do grupo salina mostraram plaquetopenia em relação ao grupo de animais sadios quando comparados cinco meses após o desafio ($p < 0.05$). No entanto, nenhum dos grupos imunizados com plasmídeos codificantes para antígenos desenvolveu alterações significantes na série branca em relação aos animais sadios (**Quadro 4**). No eritrograma foi verificado que os animais do grupo salina e plasmídeos vazios desenvolveram eritropenia ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente), diminuição da quantidade de hemoglobina ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) e diminuição do hematócrito ($p < 0.05$ e $p < 0.05$, respectivamente) em relação aos controles sadios. Contudo, nenhum dos grupos de animais imunizados desenvolveu alterações significantes na série vermelha de células sanguíneas em comparação aos controles sadios (**Quadro 5**). Nos diferentes parâmetros e tempos avaliados, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as vias de imunização intramuscular e intradérmica.

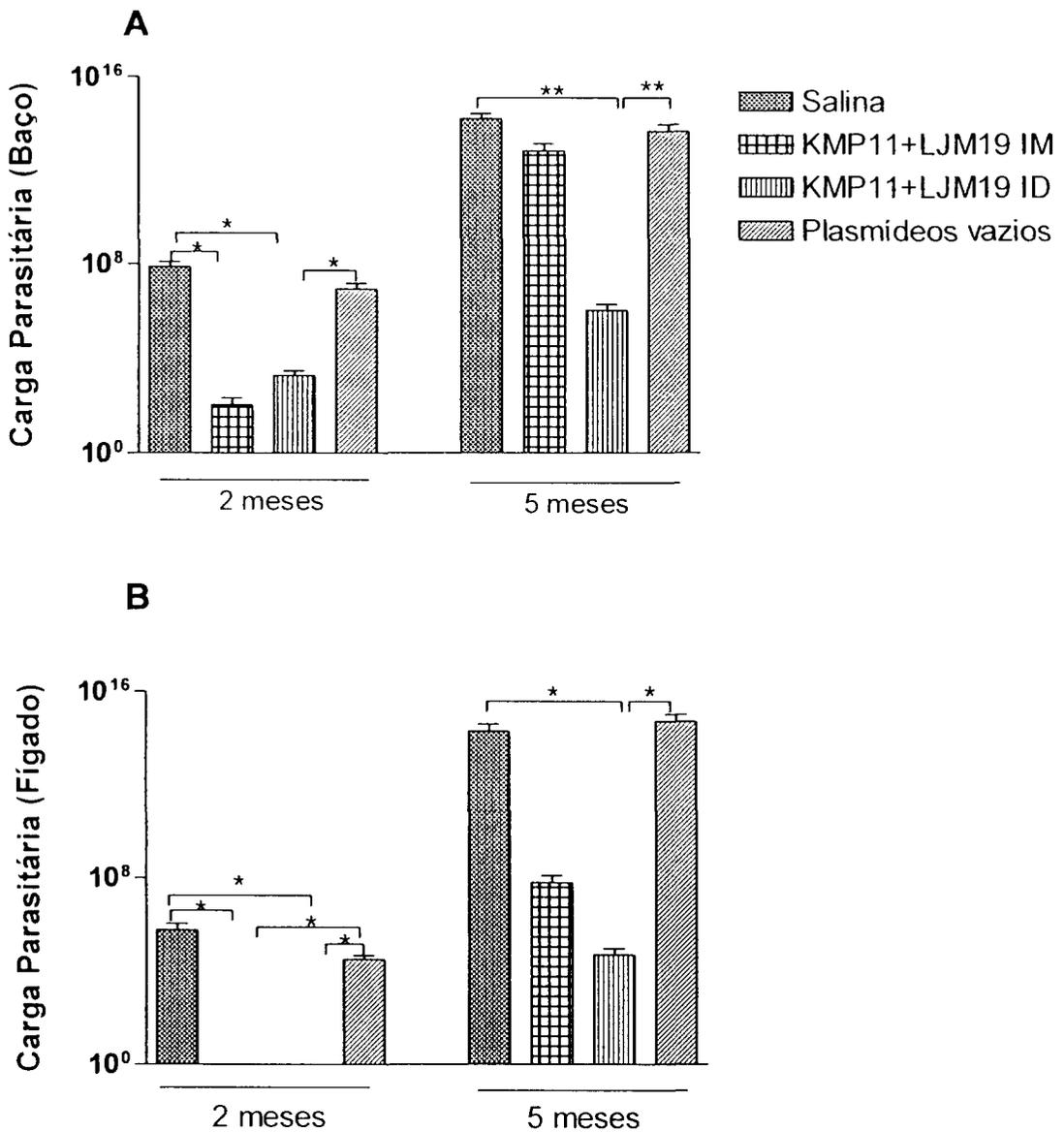


Figura 14. Cargas parasitárias esplênicas e hepáticas de hamsters imunizados por vias diferentes e desafiados com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio os baços e os fígados dos animais foram coletados e pesados. As cargas parasitárias foram avaliadas por diluição limitante (ELIDA). (A) Cargas parasitárias no baço. (B) Cargas parasitárias no fígado. n=8. *p<0.05, **p<0.01.

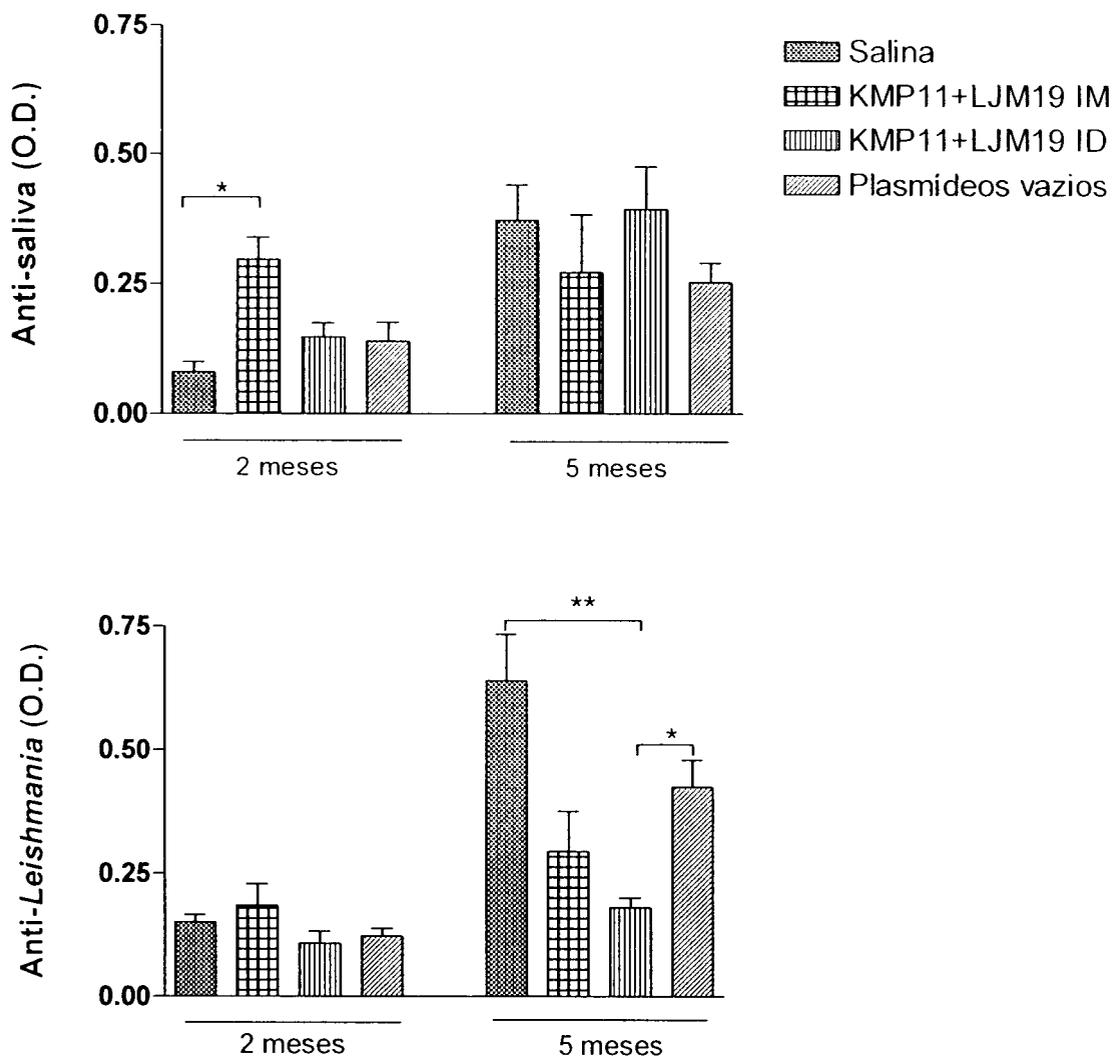


Figura 15. Produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* e anti-*Leishmania* em hamsters imunizados por diferentes vias infectados com *L. chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio os animais foram eutanasiados e amostras de sangue coletadas e soradas. A produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. As placas foram sensibilizadas com sonicação de glândula salivar de *L. longipalpis* ou com antígeno solúvel de *Leishmania* (A) Produção de anticorpos anti-saliva. (B) Produção de anticorpos anti-*Leishmania*. n=8. * p<0.05, ** p<0.01.

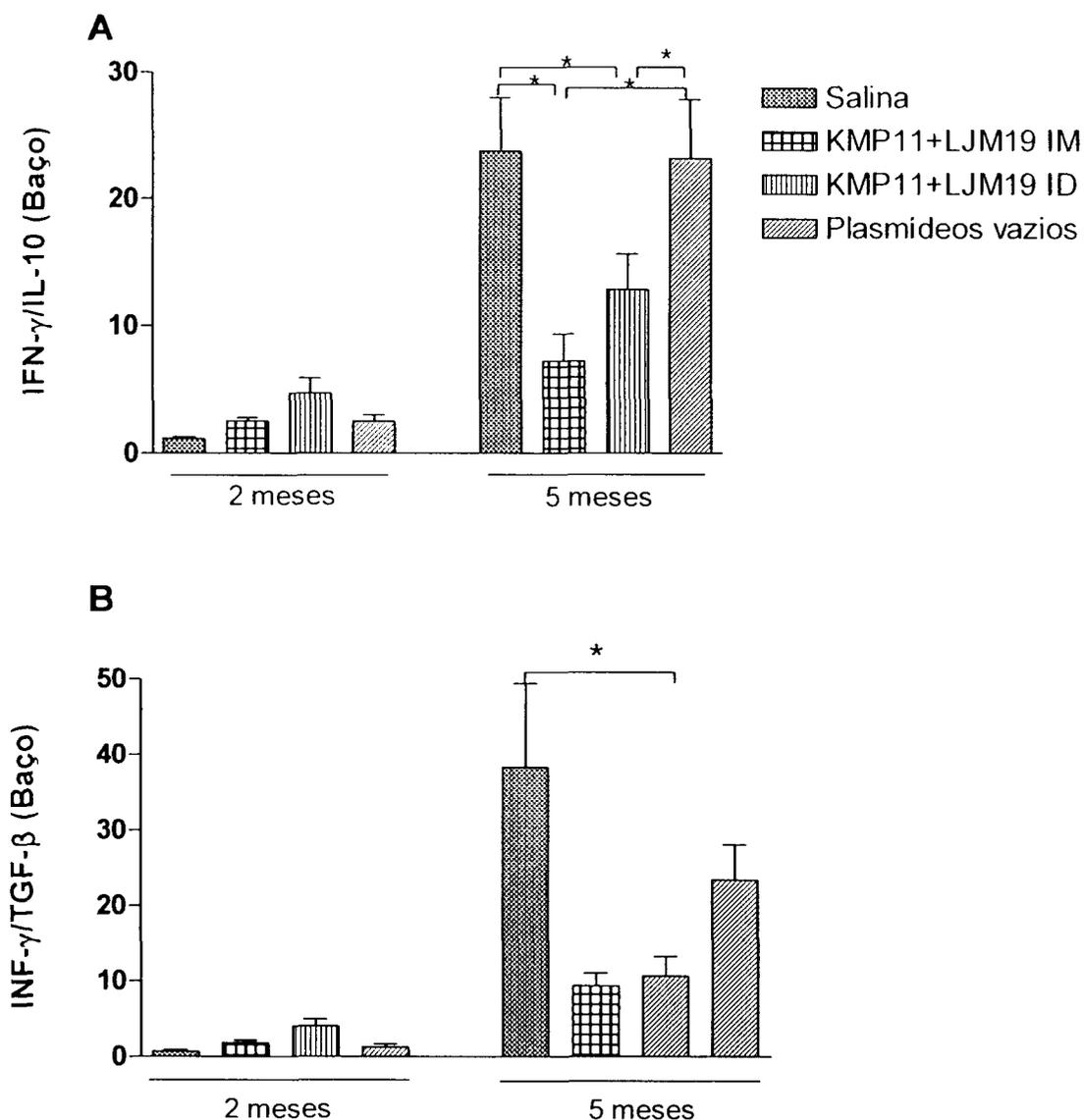


Figura 16. Produção de citocinas no baço de animais imunizados por diferentes vias e desafiados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois e cinco meses após o desafio amostras do baço foram coletadas e a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real utilizando como medida a quantificação relativa (QR) utilizando como controle hamsters não infectados. (A) Relação IFN- γ /IL-10. (B) Relação IFN- γ /TGF- β . n=8. *p<0.05.

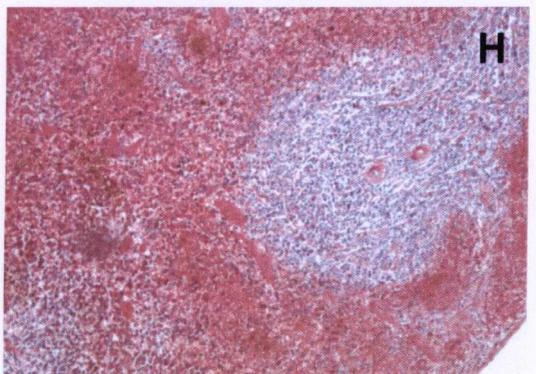
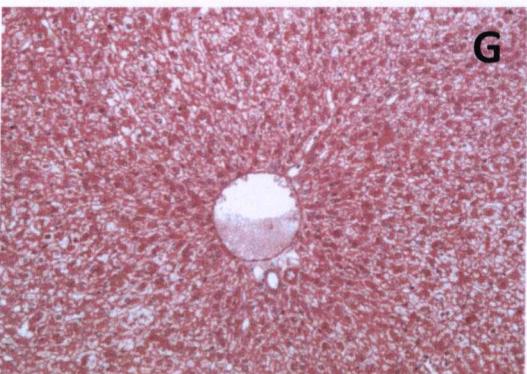
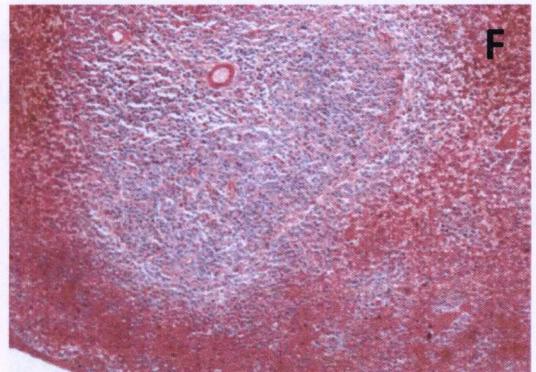
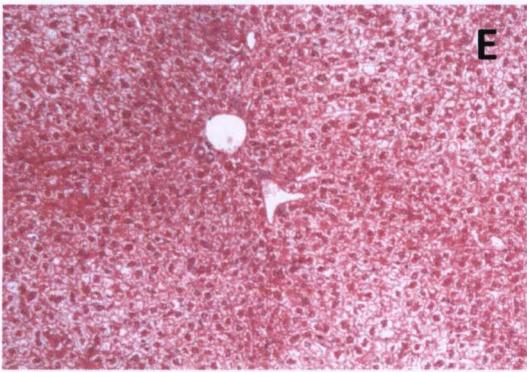
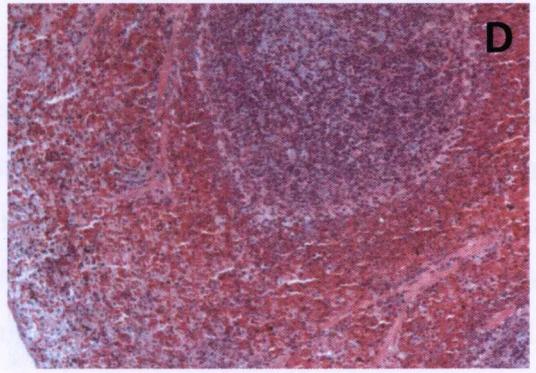
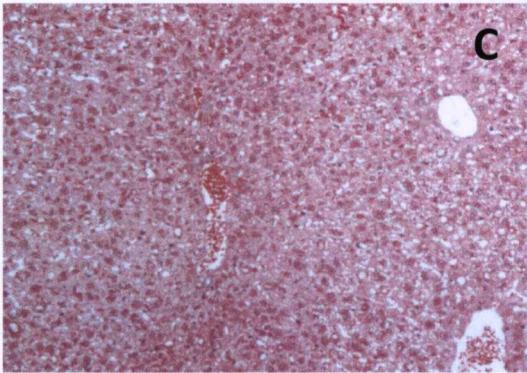
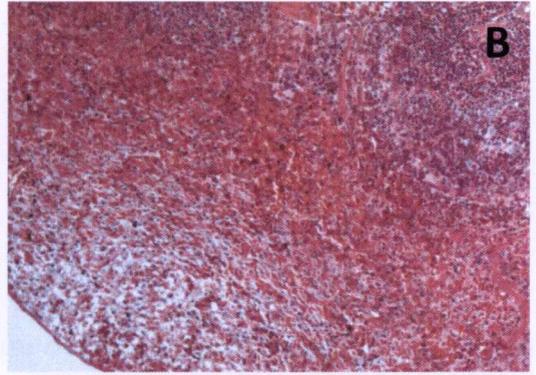
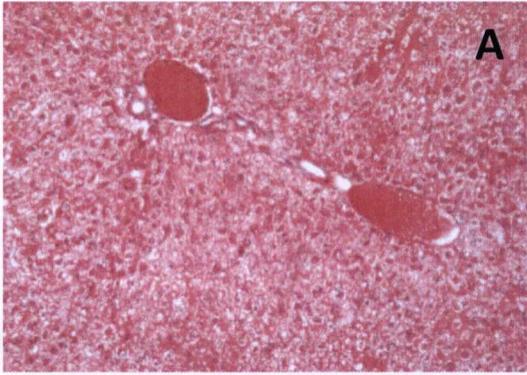


Figura 17. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses após o desafio amostras do fígado foram coletadas fixadas e coradas por H&E e avaliadas por microscopia ótica. Micrografias do fígado (A) Salina, (C) KMP11 mais LJM19 pela via intramuscular, (E) KMP11 mais LJM19 pela via intradérmica, (G) Plasmídeos vazios. Micrografias do Baço (B) Salina, (D) KMP11 mais LJM19 pela via intramuscular, (F) KMP11 mais LJM19 pela via intradérmica, (H) Plasmídeos vazios.. Aumento 10X. n=8.

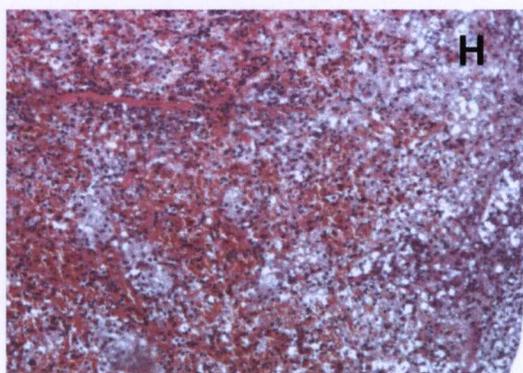
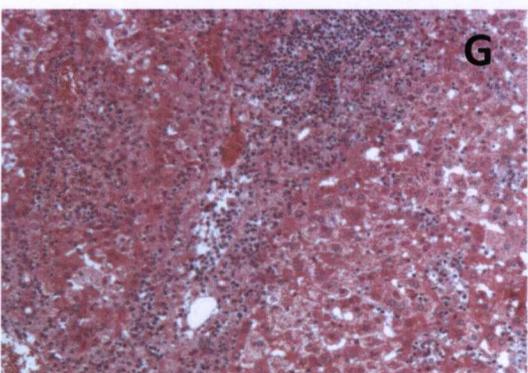
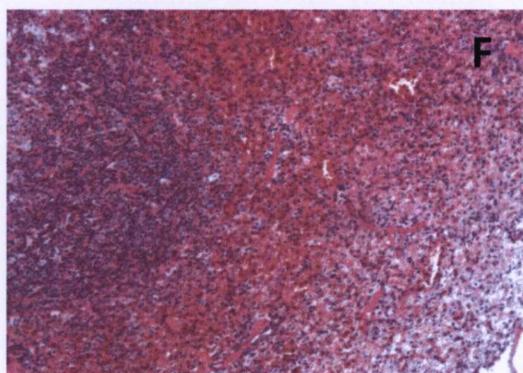
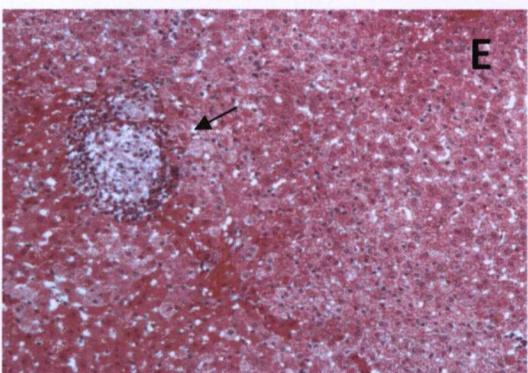
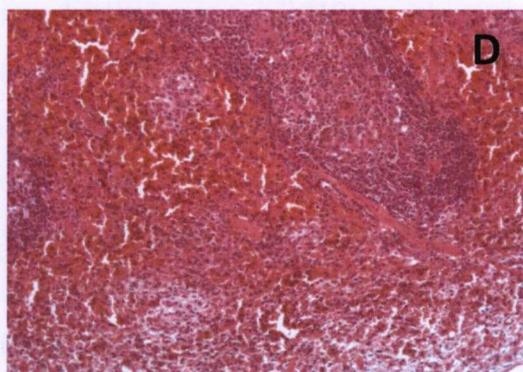
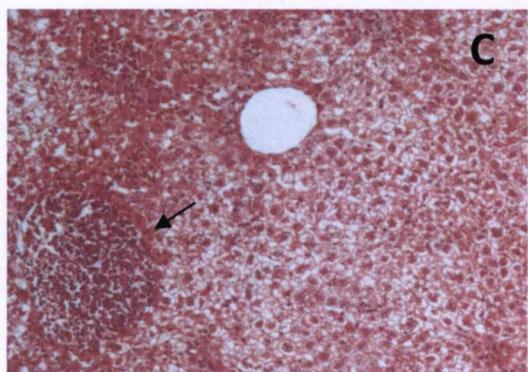
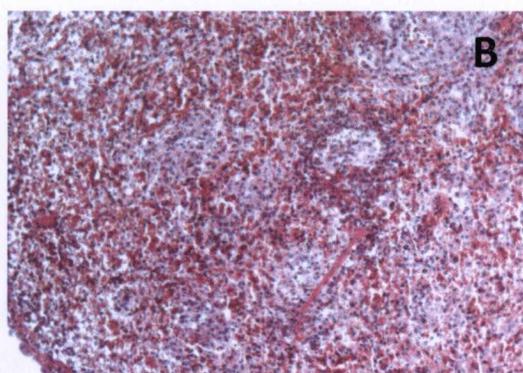
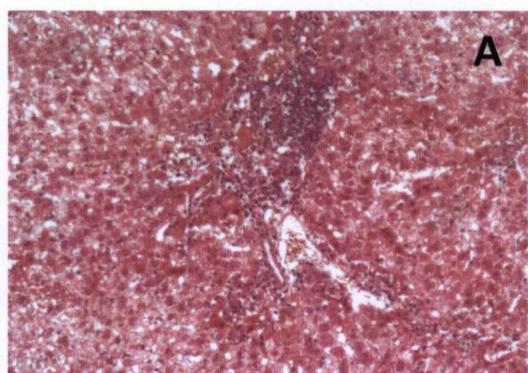


Figura 18. Análise histológica de baço e fígado de hamsters infectados com *L. chagasi* mais saliva. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Cinco meses após o desafio amostras do fígado foram coletadas fixadas e coradas por H&E e avaliadas por microscopia ótica. Micrografias do fígado (A) Salina, (C) KMP11 mais LJM19 pela via intramuscular, (E) KMP11 mais LJM19 pela via intradérmica, (G) Plasmídeos vazios. Micrografias do Baço (B) Salina, (D) KMP11 mais LJM19 pela via intramuscular, (F) KMP11 mais LJM19 pela via intradérmica, (H) Plasmídeos vazios. As setas mostram a presença de granulomas hepáticos. Aumento 10X. n=8.

	Normal	Salina		KMP11+LJM19 (IM)		KMP11+LJM19 (ID)		Plasmídeos vazios	
	Tempo 0	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
Leucócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	10.0±0.4	10.7±1.4	11.8±2.2	11.5±1.4	9.5±0.9	10.7±1.1	8.9±0.8	10.8±1.1	7.4±1.0
Linfócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	5.5±0.4	6.5±0.7	4.8±0.7	7.00±1.3	4.8±0.7	6.6±0.5	5.3±0.4	4.7±0.5	4.1±0.3
Monócitos ($10^2/\mu\text{l}$)	5.1±0.8	4.8±1.0	7.1±1.7	5.3±1.1	3.8±1.3	4.3±0.6	4.9±1.1	4.8±0.6	4.4±0.9
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	3.3±0.3	3.5±0.7	4.5±1.5	3.6±0.5	4.1±0.6	3.7±0.9	2.7±0.9	4.5±0.9	2.8±0.8
Eosinófilos ($10^2/\mu\text{l}$)	2.51±0.2	2.3±0.8	3.5±0.1	1.8±0.8	2.3±0.5	1.9±0.4	3.4±0.3	3.4±0.6	2.0±0.3
Plaquetas ($10^5/\mu\text{l}$)	2.3±0.3	1.5±0.2	1.0±0.2*	1.5±0.3	1.1±0.4	1.4±0.3	1.7±1.0	2.3±0.4	1.4±0.3

Quadro 4. Leucograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10^5 promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses e cinco meses após o desafio amostras de sangue foram coletadas e avaliadas por contador automático seguido de confirmação por microscopia óptica. As comparações estatísticas foram realizadas em comparação com o grupo de animais normais (Tempo 0). Grupo normal n=13, grupos experimentais n=6. * p<0.05.

	Normal	Salina		KMP11+LJM19 (IM)		KMP11+LJM19 (ID)		Plasmídeos vazios	
	Tempo 0	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
Hemácias (10⁶/μl)	8.5±0.1	8.1±0.1	7.3±0.6*	8.3±0.2	7.7±0.7	7.8±0.2	8.4±0.3	7.8±0.2	6.8±0.4*
Hemoglobina (g%)	16.1±0.4	14.8±0.3	13.7±0.5*	14.9±0.3	15.0±0.5	14.3±0.3	14.9±0.4	14.5±0.6	13.1±0.5*
Hematócrito (%)	47.5±0.6	45.1±0.6	39.8±1.4*	45.2±1.2	46±1.6	43.3±1.3	46.2±1.6	43.9±1.4	37.8±2.2*
VCM (fl)	56.1±0.3	55.2±0.7	55.1±0.6	54.6±0.7	54.5±0.6	55.7±0.9	55.5±0.7	55.8±0.3	54.4±0.4
HCM (pg)	18.8±0.2	18.7±0.4	18.8±0.9	18.0±0.3	17.8±0.2	18.9±0.4	17.5±0.4	18.9±0.5	19.3±0.5
CHCM (%)	34.2±0.3	33.9±0.5	34.3±0.9	32.8±0.4	32.7±0.5	34.0±0.3	31.7±0.5	34.1±0.8	34.7±1.1

Quadro 5. Eritrograma de hamsters imunizados e desafiados com *Leishmania chagasi*. Hamsters foram divididos em cinco grupos e imunizados intradermicamente (ID) na orelha com salina, KMP11 mais LJM19 ou plasmídeos vazios (pcDNA3 e VR2001-TOPO) ou intramuscularmente (IM) com KMP11 mais LJM19 por três vezes com intervalos de quatorze dias. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados com 10⁵ promastigotas de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Dois meses e cinco meses após o desafio amostras de sangue foram coletadas e avaliadas por contador automático seguido de confirmação por microscopia óptica. As comparações estatísticas foram realizadas em comparação com o grupo de animais normais (Tempo 0). n=6. * p<0.05.

8. Discussão

Diferentes trabalhos na literatura vêm demonstrando o importante papel na indução de respostas imunes protetoras contra patógenos por meio de imunização com plasmídeos de cDNA (MORENO et al., 2007; HU et al., 2007; ZANIN et al., 2007; CARTER et al., 2007). No nosso trabalho, mostramos que a imunização com plasmídeos codificantes para a proteína LJM19, componente da saliva de *Lutzomyia longipalpis*, ou a imunização com o plasmídeo codificante para a KMP11 pode conferir proteção contra desafio contra *Leishmania chagasi* mais saliva de *L. longipalpis* no modelo do hamster. No entanto, a combinação dos plasmídeos não mostrou ser capaz de induzir uma resposta protetora mais eficiente que a promovida pelos plasmídeos separados. Além disso, observamos que a imunização com plasmídeos por vias diferentes pode conduzir a geração de respostas com potências semelhantes.

Desde o início da década de 90 com a descrição dos primeiros trabalhos com plasmídeos de DNA, foi observado que estas moléculas são capazes de induzir respostas imunes humoral e celular (TANG et al., 1992; FYNAN et al., 1993). Pela capacidade de induzirem respostas de células T CD4⁺ e células T CD8⁺, proporcionam um novo caminho para o desenvolvimento de proteção contra patógenos intracelulares (IVORY & CHADEE, 2004; GARMORY et al., 2005; DUMONTEIL, 2007). Além disso, a relativa facilidade de fabricação, estabilidade, segurança e a possibilidade de produção em larga escala, fazem destas moléculas fortes candidatos para o desenvolvimento de vacinas (MCCLUSKIE & DAVIS, 1999; AZEVEDO et al., 1999; BAROUCH et al., 2004; KHAMESIPOUR et al., 2006). Diferentes autores têm mostrado que apenas a imunização com plasmídeos codificantes para determinados antígenos pode induzir a produção de anticorpos contra a molécula alvo (HIRAO et al., 2007; COLER et al., 2007). Estas respostas geralmente são acompanhadas pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e a diminuição de produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (DONDIJ et al., 2005). Da mesma forma, a imunização com plasmídeos de DNA não codificantes para antígenos, mas contendo seqüências imunoestimulatórias, pode ser capaz de induzir respostas de hipersensibilidade tardia mais potente e duradoura contra moléculas antigênicas presente em formulações vacinais utilizando combinação com antígenos solúveis de protozoários, como a

Leishmania. Esta potencialização pode ser intensificada pelo encapsulamento de plasmídeos de DNA em lipossomos (MAZUNDER et al., 2007).

Em nosso estudo, observamos que apenas a imunização com os plasmídeos KMP11, bem como KMP11 mais LJM19, foi capaz de induzir a resposta humoral contra antígenos de *Leishmania*. Os animais imunizados não mostraram produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis*. Este resultado, reafirma o achado anterior que mostrava que a imunização com plasmídeos codificantes para LJM19 não induziu a produção de IgG anti-saliva, mas leva a um forte DTH contra SGS (GOMES et al., 2008). Por ser uma molécula altamente conservada em tripanosomatídeos, a KMP11 vem chamando a atenção desde o início da década de 90 (JARDIM et al. 1991; JARDIM et al., 1995). Inicialmente identificada como uma molécula associada ao LPG e responsável em grande parte pela sua imunogenicidade, esta proteína se mostrou presente em diferentes espécies de *Leishmania* (TOLSON et al., 1994). Embora expressa nos diferentes estágios da *Leishmania*, esta proteína de 11 Kda é amplamente expressa nas formas promastigotas. Uma vez processadas por macrófagos podem ser apresentadas e reconhecidas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em modelos murinos e humanos (TOLSON et al., 1994; ALONSO et al., 1998., BASU et al., 2007). Imunizando camundongos BALB/c com plasmídeos codificantes para KMP11, foi observada uma grande produção de IgG por estes animais contra esta proteína. Uma vez desafiados, estes animais mostraram maior taxa de sobrevivência e uma menor carga parasitária quando infectados por *Trypanosoma cruzi* (PLANELLES et al., 2001).

A presença de seqüências CpG nos plasmídeos pode facilitar o desenvolvimento de respostas imunes com a produção de citocinas pró-inflamatórias (MUTWIRI et al., 2004, ZIMMERMANN et al., 2008). Diferentes trabalhos têm mostrado que animais imunizados com plasmídeos de DNA encapsulados em lipossomas podem desenvolver respostas imunes mais intensas contra diferentes antígenos (YOSHIKAWA et al., 2006; MAZUNDER et al., 2007). Uma vez que estas seqüências de DNA podem ser reconhecidas por receptores Toll, elas possuem um papel importante na ativação de células da imunidade inata (BABIUK et al., 2004; DALPKE & HEEG et al., 2004). Além disso, podem ativar a apresentação de células apresentadoras de antígeno e assim estimular a produção de IL-12, uma citocina fundamental na ligação da imunidade inata com a adaptativa (ALIBERTI et al., 2003; BASTOS et al., 2004; OLIVEIRA et al.,

2005). A IL-12 pode estimular a produção de IFN- γ por células NK. Este mecanismo se mostrou de grande importância para a geração de respostas protetoras contra parasitas intracelulares (KATO et al., 2004; MUTWIRI et al., 2004; VIVIER et al., 2006).

Hamsters apresentaram uma grande produção de IFN- γ nos linfonodos drenantes das imunizações com plasmídeos codificantes para LJM19 e/ou KMP11. No entanto, cada plasmídeo ou a sua combinação foi capaz de induzir respostas em tempos diferentes nos animais estudados. Hamsters imunizados com o plasmídeo codificante para LJM19 mostraram um pico de estimulação 14 dias após a última imunização. De forma diferente, os animais imunizados com o plasmídeo codificante para KMP11 mostraram um pico de produção de IFN- γ 21 dias após a última imunização. Contudo, a combinação dos plasmídeos mostrou uma elevação da produção desta citocina 14 dias após a última imunização sem, no entanto, ter uma produção mais elevada que as fornecidas pelas imunizações com os plasmídeos separados. Esta produção de citocina com tempos diferenciados pode ser importante no entendimento dos mecanismos temporais de resposta a patógenos, uma vez que os animais tenham sido desafiados. Esta produção de citocinas pró-inflamatórias em tempos precoces pode ser um fator chave na ativação de células NK, linfócitos e células apresentadoras de antígeno, elevando a produção de IL-12, aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias com direcionamento e definições de padrões de respostas (GORDON, 2002; ALIBERTI et al., 2003; HARIZI & GALDI, 2005; RODRIGUES et al., 2006; COOPER & KHADER, 2006; NEWMAN & RILEY, 2007; TUPIN & KRONENBERG, 2007). Este ambiente inflamatório pode ser desfavorável ao estabelecimento de parasitas intracelulares uma vez que pode ser um local com elevada produção de componentes reativos derivados do oxigênio (EVANS et al., 1993; MURRAY & NATHAN, 1999; MURRAY et al., 2006). Estes mecanismos juntos podem atuar de forma sinérgica contribuindo para a morte de parasitas e a geração de mecanismos protetores contra a *Leishmania*.

Quando desafiados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis* os animais imunizados com LJM19 apresentaram relações elevadas entre IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β nos linfonodos drenantes. Mesmo em menor intensidade, este aumento também é observado nos animais imunizados com KMP11 e com os dois plasmídeos fornecidos em conjunto. Esta elevada produção de IFN- γ nos linfonodos drenantes nos

dias que sucedem o desafio é um bom indicador da geração de mecanismos imunes que contribuirão para a destruição dos parasitos inoculados na derme da orelha. Diversos artigos mostram o papel da IL-10 como uma citocina anti-inflamatória capaz de desativar macrófagos, diminuindo a produção de óxido nítrico e favorecendo o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (GHALIB et al., 1993; OLIVER et al., 2005). Da mesma forma, o TGF- β tem sido apontado como uma citocina importante para a sobrevivência dos parasitos nas células do hospedeiro. Ao desativar células fagocitárias, o TGF- β pode facilitar a proliferação de parasitos no interior de macrófagos e fornecer amplo suporte na progressão para a doença (GANTT et al., 2003). Administração de anticorpos neutralizantes para TGF- β a camundongos selvagens, ou a infecção de nocautes para o receptor do TGF- β II conduz a lesões menos agressivas em BALB/c infectados com *L. major* (GORELIK et al., 1998; LI et al., 1999).

É um fato notório na literatura que a exposição aos componentes salivares dos flebotomíneos vetores pode facilitar o estabelecimento da infecção por *Leishmania*. O papel da saliva foi demonstrado pela primeira vez na década de 80, desde então, muitos estudos vêm demonstrando que a saliva de flebotomos possui um número imenso de moléculas que podem imunomodular a resposta do hospedeiro (TITUS et al., 1988; ANDRADE et al., 2007). A importância da saliva dos flebotomos na infecção tem sido demonstrada tanto em modelos animais como em humanos (BARRAL et al., 2000, GUILPIN et al., 2002, COSTA et al., 2004). Entrando em contato com as células do hospedeiro pela primeira vez, os componentes salivares podem montar um ambiente que favorece o parasito. Neste caso, é observada a produção de citocinas como IL-10, IL-4 e IL-13 associada a uma diminuição na produção de citocinas como o IFN- γ (KAMHAWI, 2000; ROGERS & TITUS, 2003; NORSWORTHY et al., 2004). Devido a sua importância, componentes salivares de diferentes vetores têm sido estudados e identificados mostrando que ocorrem diferenças nas composições salivares a depender da espécie do flebotomo e da região geográfica estudada (SACKS & KAMHAWI, 2001; SACKS, 2001; VALENZUELA et al., 2003; ROHOUSOVÁ & VOLF, 2006). O fato de ser reconhecida tanto por modelos animais como humanos bem como sua influência no desenvolvimento de lesões mais severas, levou ao estudo epidemiológico visando um maior conhecimento do papel da saliva de vetores em áreas endêmicas para

a leishmaniose (BARRAL et al., 2000; ROHOUSOVÁ et al., 2005; TITUS Et al., 2006).

Contudo, foi o estudo mostrando que a pré-sensibilização com componentes salivares poderia conferir proteção contra um desafio realizado com *Leishmania* mais saliva que abriu novas perspectivas de estudo (BELKAID et al., 1998). Diferentes autores mostraram fato semelhante com diferentes espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos (THIAKAKI et al., 2005; MORRIS et al., 2001). Camundongos BALB/c naturalmente expostos a picadas de *L. longipalpis* podem responder com a formação de um infiltrado inflamatório no sítio da picada (SILVA et al., 2005). A demonstração de que camundongos imunizados com plasmídeos de DNA codificando a proteína SP15 de *Plebotomus papatasi* foram capazes de serem protegidos contra um desafio com *L. major*, e que esta proteção está relacionada com o desenvolvimento de respostas celulares, mostra que a imunização com plasmídeos codificando proteínas salivares pode influenciar e promover respostas imunes protetoras contra *Leishmania* (VALENZUELA et al., 2001). Da mesma forma, foi demonstrado que a imunização com plasmídeos codificando LJM19 pode induzir a um recrutamento celular e desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) no local das imunizações após a picada de flebotomos não infectados (GOMES et al., 2008).

No nosso estudo, foi observado que hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para LJM19 e KMP11 desenvolvem DTH quarenta e oito horas após o desafio constituído de *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Da mesma forma, o aumento da espessura da orelha dos animais imunizados com os dois plasmídeos administrados em conjunto foi observado. Animais imunizados três vezes com SGS de *L. longipalpis* na orelha quando inoculados novamente com SGS quatorze dias após a última imunização desenvolvem um intenso recrutamento de células inflamatórias no local das imunizações (TAVARES et al., comunicação pessoal). Este infiltrado é em grande parte constituído de células mononucleares. No entanto, polimorfonucleares como neutrófilos e raros eosinófilos também podem ser visualizados. O desenvolvimento de DTH tem sido correlacionado com mecanismos de proteção contra leishmaniose em diferentes modelos (KAMHAWI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2005; MAZUNDER et al., 2007). O perfil das células presentes nestes infiltrados é visto como determinante no desenvolvimento da patologia. As respostas com a presença linfócitos

T CD4⁺, T CD8⁺, células NK nos infiltrados inflamatórios podem ser uma fonte de IFN- γ (KHARAZMI et al., 1999; HENNINO et al., 2007). A presença de macrófagos ativados com a produção de IL-12 e produção de óxido nítrico montam um ambiente desfavorável para a *Leishmania* (STEBUT et al., 2002; STEBUT, 2007). Interessantemente, a produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* coincide com a geração de DTH em habitantes de área endêmica para a leishmaniose visceral (GOMES et al., 2000). Tem sido proposto que a neutralização de componentes salivares de *L. longipalpis* por anticorpos ou resposta imune mediada por células contra estas proteínas salivares, permite a montagem de uma resposta anti-leishmania mais eficiente (GOMES et al., 2000).

Alguns autores também têm relatado a importância dos neutrófilos nestes infiltrados inflamatórios. Já foi demonstrado que estas células estão entre as primeiras a chegarem nos locais de infecção por *L. major* (BELKAID et al., 2000). Estas células parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de uma imunidade protetora (CHEN et al., 2005). A depleção de neutrófilos de camundongos resistentes (C3H/HeJ) exacerbou a doença conduzindo ao desenvolvimento de lesões maiores, elevados níveis de IL-4 e maiores cargas parasitárias (CHEN et al., 2005). Recentemente foi demonstrado que macrófagos infectados por *L. major* ao interagirem com neutrófilos apoptóticos de camundongos C57BL/6 foram capazes de destruir o parasito pela ação da elastase neutrofilica bem como, pela produção de TNF- α oriunda dos neutrófilos (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Contudo, foi demonstrado que a ingestão de neutrófilos apoptóticos infectados por *L. major* por macrófagos humanos aumenta a liberação de TGF- β dando suporte a um papel deletério aos neutrófilos na leishmaniose (VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

A presença de células com um perfil inflamatório pode ter contribuído para a diminuição das cargas parasitárias observadas nas orelhas 7 e 14 dias após o desafio em nosso trabalho. No entanto, mesmo com as elevadas relações entre IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β nos linfonodos drenantes, não foi observada a diminuição das cargas parasitárias nestes sítios 7 e 14 dias após o desafio. Contudo, de acordo com o abordado até então, provavelmente ocorra a morte dos parasitos nas semanas que se sucedem. Interessante é o fato de que os animais apenas imunizados com KMP11 e que não sofreram desafio apenas desenvolvem resposta com grande produção de IFN- γ

vinte e um dias após a última imunização. Desta forma, é provável que uma temporalidade também possa ser observada após desafio com *L. chagasi* mais SGS. O controle dos parasitos ainda no linfonodo pode ser importante, pois desta forma, com a maior destruição dos parasitos seria possível uma disseminação menor para os demais órgãos e assim a observação de menores graus de visceralização por *L. chagasi*.

Modelos murinos têm sido extensivamente utilizados para o estudo de infecções causadas por *L. donovani* e em menor grau com *L. chagasi/infantum*. No entanto, mesmo as formas susceptíveis de camundongos curam suas infecções sendo bons modelos para o estudo de formas auto-limitadas da doença (WILSON et al., 2005). Desta forma, para estudar mecanismos de proteção na leishmaniose visceral escolhemos o hamster como modelo experimental. Estes animais apresentam uma progressão da doença com replicação parasitária no baço, fígado e medula óssea e se não tratados com fármacos antiparasitários sucumbem e morrem (MELBY et al., 2001, ANSTEAD et al., 2001). No nosso estudo, hamsters não imunizados com plasmídeos ou imunizados com plasmídeos vazios apresentam uma elevada carga parasitária no baço e no fígado dois meses após o desafio. Por outro lado, os animais imunizados com os diferentes plasmídeos codificantes para LJM19 e/ou KMP11 mostram uma redução significativa das cargas parasitárias nestes órgãos. Recentemente, foi demonstrado que a imunização de hamsters com plasmídeos codificantes para KMP11 foi capaz de proteger estes animais contra um desafio mortal realizado por cepas de *L. donovani* tanto susceptíveis como resistentes ao glucantime (BASU et al., 2005). Neste trabalho, foi mostrado que os animais imunizados mostraram maior sobrevivência e menores cargas parasitárias no baço e no fígado 2 e 4 meses após o desafio. No fígado, não foram detectados parasitos até quatro meses após o desafio (BASU et al., 2005). Esta proteção foi relacionada com o aumento da atividade da oxido nítrico sintetase induzível, IFN- γ e a geração de IL-4 associada a uma diminuição da produção de IL-10. Desta forma, evidenciaram uma resposta mista correlacionada com proteção em um modelo para a leishmaniose visceral (BASU et al., 2005).

A IL-10 é uma citocina com efeito pleiotrópico em uma variedade de células do sistema imune (HOWARD et al., 1993). Notavelmente é um potente supressor de todos os mecanismos microbicidas efetores conhecidos de macrófagos ativados. A IL-10 inibe a capacidade produtora de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, G-CSF, GM-

CSF), radicais reativos do oxigênio e reativos intermediários do nitrogênio por macrófagos ativados por IFN- γ ou LPS (OSWALD et al., 1992; KARP et al., 1993). A associação da IL-10 com a leishmaniose visceral está firmemente estabelecida. Pacientes com a forma ativa de leishmaniose mostram elevada produção desta citocina por células do sangue periférico bem como uma elevada produção de RNAm nos sítios infectados (NYLEN & SACKS, 2007). Embora níveis elevados de IL-10 possam ajudar a controlar efeitos patológicos mediados por respostas imunes pró-inflamatórias excessivas, especialmente no fígado, suas atividades imunossupressoras podem promover a replicação parasitária e a progressão da doença (NYLEN & SACKS, 2007). Sob as mesmas condições, o TGF- β pode suprimir o desenvolvimento de respostas Th1 e inibir a ativação de macrófagos favorecendo o estabelecimento do parasita (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Diferentes trabalhos têm mostrado a imunogenicidade e grau de conservação da KMP11 (FUERTES et al., 1999; RAMÍREZ et al., 2002; BERBERICH et al., 2003; DELGADO et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; DIEZ et al., 2006). Tanto pacientes com doença de chagas como com leishmaniose são capazes de reconhecer a KMP11 por meio de anticorpos (THOMAS et al., 2001). Epítopos da KMP11 são capazes de ser apresentados via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I) a células TCD8⁺ por macrófagos humanos infectados por *L. donovani* (BASU et al., 2007a). Em resposta a estes mecanismos de apresentação, células T CD8⁺ humanas são ativadas e produzem grande quantidade de IFN- γ (BASU et al., 2007a). Uma função importante das células T CD8⁺ é a sua implicação na leishmaniose cutânea, uma vez que a depleção destas células resultou na inibição do efeito protetor de uma vacina de DNA codificante para LACK (GURUNATHAN et al., 2000). Assim, com a ativação de células citolíticas foi demonstrado que camundongos infectados com *L. donovani* tratados com macrófagos transfectados com KMP11 tiveram suas cargas parasitárias no baço e no fígado diminuídas (BASU et al., 2007b). Este fato foi associado a uma forte atuação de células T CD8⁺ e a concomitante inibição de IL10, mas não de IL-4 ou IL-13 (BASU et al., 2007b).

Nos nossos experimentos, os animais imunizados mostram uma discreta elevação da relação entre IFN- γ /IL-10 dois meses após o desafio em células do baço. No entanto, mostram maiores relações IFN- γ /TGF- β no baço sendo que o grupo

imunizado com KMP11 mostrou um aumento de dez vezes desta relação quando comparados aos grupos controles. As relações elevadas nos linfonodos sete e quatorze dias após a infecção podem ter contribuído para uma grande destruição de parasitas e atuar retardando a chegada de parasitas nestes sítios. Neste contexto, parasitas que alcançam estes órgãos em tempos mais tardios encontram um ambiente inflamatório que pode retardar o crescimento parasitário, impedindo que ocorram grandes aumentos das cargas parasitárias nos animais imunizados. Cinco meses após o desafio, os animais imunizados ainda apresentam uma carga parasitária menor que as observadas nos animais controles. Contudo, mesmo os animais imunizados já apresentam uma elevação das cargas parasitárias no baço e no fígado. Diferentemente de Basu e colaboradores, nossos animais apresentaram parasitas no fígado em tempos mais prolongados de infecção (BASU et al., 2005). Entretanto, mesmo com resultados promissores em hamsters é bom destacar que imunização com plasmídeos codificantes para antígenos em outros modelos com primatas ou seres humanos induzem respostas imunes de baixa intensidade que nem sempre estão relacionadas com proteção duradouras (FULLER et al., 2007; HIRAO et al., 2008). Estes resultados reforçam as diferenças de respostas encontradas nos diferentes modelos animais estudados e nos que cuidados que não devem ser esquecidos na eleição de candidatos a vacinas, quando o objetivo é o uso em seres humanos.

A combinação dos plasmídeos codificantes para KMP11 e LJM19 não intensificou a capacidade protetora observada nos animais imunizados com os plasmídeos separados. Provavelmente, por ser com estas formulações vacinais e com a metodologia aplicada, o efeito máximo protetor possível. Além disso, Tzelepis e colaboradores, 2008, reportam a existência de imunodominância entre antígenos. Neste contexto, a competição entre células T CD8⁺ por moléculas do MCH apresentando antígenos pode ter contribuído para o não aumento da proteção observada pela imunização com os plasmídeos administrados em conjunto. Métodos com abordagens diferentes de imunização, podem ser buscados para a superação destes obstáculos. Imunização pelo protocolo do *Prime/booster* tem mostrado bons resultados no estudo de candidatos à vacina contra a leishmaniose (DONDJJI et al., 2005; RAMOS et al., 2008). Da mesma forma, o encapsulamento de diferentes antígenos em lipossomos e nanopartículas tem tido bons resultados (GREENLAND & LETVIN, 2007). Sharma e colaboradores, 2006, observaram que a imunização de hamsters com lipossomos

encapsulando antígenos de promastigotas de *L. donovani* pode induzir a ativação de células T CD4⁺ e células CD8⁺ específicas contra os antígenos parasitários estudados. Estas células possuíam elevada capacidade citolítica e de produção de IFN- γ e desta forma induziram proteção contra a leishmaniose visceral.

Pacientes com Kalazar desenvolvem hipergamaglobulinemia e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em seus soros é um achado freqüente (revisto em SAHA et al., 2006). Embora seja conhecido que a produção de IFN- γ provavelmente estimula a produção de IgG1 e IgG3 e que citocinas como IL-4 e IL-5 induzem a produção de IgG4 em humanos, o papel dos elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* na patogênese ainda não está bem estabelecido (ABBAS et al., 1996). Em camundongos a produção de IgG1 está relacionada com a resposta Th2 enquanto que a produção de IgG2a está relacionada com a resposta Th1 (AGUILAR-BE et al., 2005). No entanto, em hamsters ainda não existe um consenso acerca deste padrão de resposta, mesmo que muitos autores considerem a produção de IgG1 esteja correlacionada com a resposta Th2. Nos nossos experimentos, hamsters imunizados com os plasmídeos codificantes para LJM19 e KMP11 administrados em conjunto, apresentaram uma menor produção de IgG total anti-*Leishmania*. No entanto, não foram observadas diferenças na produção de anticorpos anti-*Leishmania* sete e quatorze dias bem como dois meses após o desafio com *L. chagasi*. Estes menores títulos de anticorpos em nossos dados se correlacionam com maior proteção dos animais imunizados com plasmídeos codificantes para LJM19 e/ou KMP11 administrados em conjunto.

A produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* tem sido relacionada com proteção contra *Leishmania* (GILLESPIE et al., 2000; SACKS & KAMHAWI, 2001; ROHOUSOVÁ et al., 2005; ROHOUSOVÁ & VOLF, 2006). Teoricamente, se a saliva pode exacerbar a infecção pela capacidade imunomodulatória dos seus componentes, a produção de anticorpos contra estas proteínas poderia neutralizar estes efeitos e assim favorecer o hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2000). No entanto, em nossos experimentos, não foi encontrada diferenças estatisticamente significantes na produção de anticorpos anti-saliva de *L. longipalpis* quando os animais foram imunizados e desafiados pela via intradérmica e avaliados dois e cinco meses após o desafio com *Leishmania* mais SGS.

Em camundongos infectados por *L. donovani* ocorre um aumento da carga parasitária no fígado nas primeiras quatro semanas, mas ocorre um controle desta carga parasitária até a oitava semana (MURRAY, 1999; WILSON et al., 2005). Na leishmaniose visceral humana a presença de granulomas hepáticos parece estar correlacionada com o controle espontâneo e manutenção de uma infecção subclínica (MURRAY, 1999). A estrutura de granulomas induzidos por parasitas intracelulares consiste em um centro com macrófagos, geralmente infectados, circundados por um manto de células mononucleares contendo monócitos e linfócitos, tanto T CD4⁺ como T CD8⁺ (MURRAY, 1999). O desenvolvimento de granulomas hepáticos está diretamente ligado com a diminuição da carga parasitária de camundongos infectados com *L. donovani* (MURRAY, 2001). O influxo celular para estes granulomas é dependente de quimiocinas (BARBI et al., 2007). Além disso, para o desenvolvimento adequado destes granulomas, citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos são necessárias, bem como a elaboração adequada de componentes reativos do oxigênio (MURRAY, 1999; MURRAY, 2001; WILSON et al., 2005). Embora, a inflamação possa ser protetora, ela pode ser responsável por vários danos aos hepatócitos e as células parenquimatosas hepáticas (COSTA et al., 2007). Nos nossos experimentos, não foi possível a detecção de citocinas por PCR em tempo real. Provavelmente, a grande quantidade de hepatócitos e a quantidade relativamente pequena de células inflamatórias produtoras de citocinas tenha dificultado a quantificação relativa de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias neste sítio de infecção.

No nosso modelo, apenas o grupo de animais imunizados com KMP11 mostrou a presença de granulomas hepáticos dois meses após a infecção. Sendo que nesta fase após o desafio, a arquitetura hepática de quase todos os animais dos diferentes grupos experimentais se mostrou conservada e sem maiores alterações. No entanto, todos os grupos imunizados mostraram a presença de granulomas quando avaliados cinco meses após a infecção. Um achado comum nos grupos de animais estudados foi a presença de infiltrados inflamatórios periportais com a presença de numerosas células mononucleares bem como polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. Embora a presença de granulomas hepáticos tenha sido observada nos animais dos grupos imunizados não foi possível a visualização de parasitas no interior dos fagócitos nos centros destas estruturas. Nossos achados estão de acordo com os achados de Basu e

colaboradores. 2005. que demonstraram a presença de granulomas hepáticos em hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para KMP11. Além disso, Gomes e colaboradores. 2008, mostraram que a imunização com LJM19 foi capaz de induzir a formação de granulomas hepáticos em hamsters cinco meses após o desafio com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Estes achados foram correlacionados com menores cargas parasitárias no fígado nos tempos avaliados.

O fato de o hamster ser um animal muito susceptível a infecções intracelulares pode estar contribuindo para o não controle das cargas parasitárias. Apesar do potencial de suas células responderem com a formação de granulomas e a presença de células mononucleares, o que é de extrema importância para a geração de respostas protetoras, eles não são bons indutores da óxido nítrico sintetase (KAYE et al., 2004, PEREZ et al., 2006). Espécies reativas do oxigênio são moléculas essenciais para o controle de parasitas intracelulares e para a geração de respostas imunes adequadas (HILDEMAN, 2004; SINGH et al., 2004). Diferentes autores têm demonstrado que uma produção adequada de componentes reativos do oxigênio é de extrema importância para o controle da infecção causada por *Leishmania* (EVANS et al., 1993; MURRAY & NATHAN, 1999; MURRAY et al., 2006).

De acordo com o discutido, geralmente é aceito que IFN- γ é necessário para o controle e proteção das infecções por *Leishmania*. Entretanto, muitos trabalhos na literatura mostram que pacientes com a forma ativa da leishmaniose visceral apresentam uma elevada concentração de IFN- γ no plasma (HAIULU et al., 2004; CALDAS et al., 2005; PERUHYOE-MAGALHÃES et al., 2006; ANSARI et al., 2006a). Além disso, outras citocinas como fator de necrose tumoral- α , IL-1, IL-6 também se mostram elevadas (HAIULU et al., 2004; PERUHYOE-MAGALHÃES et al., 2005; ANSARI et al., 2006b). Estes dados mostram que mediadores envolvidos na produção e atividade do IFN- γ , são características da leishmaniose visceral humana. Estas citocinas podem exercer um papel importante na imunopatogênese desta patologia (HAILU et al., 2004). Nossos animais controles mostraram maiores relações ente IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β no baço cinco meses após o desafio que aquelas apresentadas pelos animais imunizados com plasmídeos codificantes para antígenos. Assim, mesmo com uma elevada produção de IFN- γ estes animais ainda possuem cargas parasitárias elevadas.

Muito têm sido descrito acerca da especificidade das respostas em diferentes sítios do corpo. Em camundongos infectados por *L. donovani* é observado o controle do

parasitismo no fígado cerca de 8 semanas após o desafio. No entanto, o baço parece permanecer como uma fonte de persistência do parasita (WILSON et al., 2005). Foi demonstrado que a produção de IFN- γ e IL-12 em fases mais avançadas da infecção de camundongos BALB/c por *L. donovani* pode ser requerida para o controle da infecção, mas não o suficiente para eliminar o parasita (MELBY et al., 2001). O baço fornece um ambiente apropriado para a ativação de linfócitos T e células NK por células apresentadoras de antígeno durante a infecção por *L. donovani* (ENGWERDA & KAYE, 2000; STANLEY & ENGWERDA., 2007). No entanto, esplenócitos de pacientes humanos com kalazar produzem elevada quantidade de IFN- γ sem que seja observado, desta forma, o controle do parasita (KARP et al., 1993; KENNY et al., 1998). Dest modo, tem sido demonstrado que o não controle do parasita não pode ser explicado simplesmente por tolerância imunológica ou polarização da resposta (NYLÉN & SACKS, 2007). A produção de IL-10 por células do baço também tem sido correlacionada com a patologia humana e recentemente foi mostrado que a produção desta citocina no baço é realizada por células CD25⁺Foxp3⁻ (NYLÉN et al, 2007).

Com a progressão da doença, alterações hematológicas são frequentemente observadas tanto em humanos infectados com formas visceralizantes como em modelos experimentais para leishmaniose visceral (FERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2004; CALDAS et al., 2006; MORENO et al., 2007). Ao reproduzirem achados clínico-patológicos como observados nos humanos, hamsters desenvolvem eritropenia, plaquetopenia e leucopenia (MELBY et al., 1998). Pela produção de citocinas em elevadas quantidades, o parasitismo da medula óssea pode perturbar o comportamento das células das linhagens hematopoéticas (PASTRONIO et al., 2002; YARALI et al., 2002). A produção de quantidades elevadas de TNF- α pode induzir o desenvolvimento de mielodisplasia. Esta desordem pode conduzir a pancitopenia além de hiperesplenismo, hemólise e hiperplasia do sistema fagocítico mononucler causando retenção anormal de ferro na leishmaniose visceral (PASTRONIO et al., 2002; YARALI et al., 2002).

Nos nossos achados, vimos que hamsters imunizados com plasmídeos codificantes para LJM19 e/ou KMP11 não desenvolveram alterações hematológicas significantes cinco meses após o desafio. No entanto, os animais dos grupos controles desenvolveram eritropenia, redução do hematócrito e da quantidade de hemoglobina

quando comparados com animais sadios. Estes dados mostram, mesmo que indiretamente, uma melhora na qualidade de vida destes animais, uma vez que, a homeostasia da série eritrocítica está diretamente relacionada com diferentes atividades fisiológicas normais que dependem do transporte de oxigênio.

As células que primeiro entram em contato com antígeno com potencial protetor exercem um papel fundamental no tipo de resposta imune que será gerada (FYNNAN et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1999; VILELA et al., 2007). Além disso, as formas como os antígenos são entregues também podem influenciar o tipo de resposta imune a ser desenvolvida (SALDARRIGA et al., 2006; TSANG et al., 2007; DUMONTEIL et al., 2007). Embora a imunização pela via intramuscular tenha exibido ótimos resultados em diferentes trabalhos na literatura, no nosso estudo vimos que a imunização pela via intradérmica pode induzir ao desenvolvimento de uma resposta mais duradoura (ZANIN et al., 2007). Provavelmente, uma maior população de células apresentadoras na derme possa ter contribuído para este tipo de comportamento no perfil de resposta mais duradouro (HUNSAKER et al., 2001). A geração eficiente de células efectoras T CD8⁺ pode ser um fator central neste contexto uma vez que estas células são importantes para o controle de parasitas intracelulares (HUSTER et al., 2006). Alguns autores utilizam agentes tóxicos para potencializar o papel imunogênico de vacinas administradas pela via intramuscular (OLIVEIRA et al., 1999). Estes agentes podem induzir a morte de miócitos e o recrutamento de células inflamatórias para o local das imunizações, além disso, podem produzir boas respostas aos antígenos desejados (HUNSAKER et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1999).

De acordo com nossos resultados, podemos imaginar que a via de imunização pela via intradérmica pode induzir respostas sistêmicas prolongadas. Os animais imunizados pela via intramuscular também desenvolvem respostas sistêmicas. A formação de granulomas hepáticos é observada tanto em animais imunizados pela via intradérmica como pela via intramuscular. Entretanto, cinco meses após o desafio podemos observar uma elevação da carga parasitária no baço dos animais imunizados pela via intramuscular. No entanto, a produção de anticorpos anti-saliva dois meses após o desafio nos animais imunizados pela via intramuscular se correlaciona com a proteção destes animais dois meses após o desafio. Contudo, não foram observadas nestes animais diferenças estatisticamente significante, quanto à produção de anticorpos

anti-*Leishmania* quando foram comparados com os animais controles dois e cinco meses após o desafio.

Nossos resultados nos mostram a importância da rota na entrega de antígenos quando o objetivo é a obtenção de mecanismos protetores. As primeiras células que entram em contato com os plasmídeos são de fundamental importância na definição de padrões de ativação celular e na geração de respostas efetoras. Os plasmídeos utilizados neste estudo podem estar gerando ambientes inflamatórios que podem conter o parasita nos momentos iniciais após infecção e isso interferir nos mecanismos de visceralização. Estes fatores em conjunto favorecem para o desenvolvimento de menores cargas parasitárias nos sítios estudados e para o desenvolvimento de manifestações indicadoras de proteção como o não desenvolvimento de distúrbios hematológicos mais acentuados bem como as menores cargas parasitárias nos sítios de visceralização.

9. Conclusão

Este trabalho demonstra pela primeira vez que a imunização com KMP11 confere proteção de hamsters contra a infecção por *Leishmania chagasi*. No entanto, apesar dos plasmídeos que codificam as proteínas LJM19 e KMP11 serem antigênicos, a combinação dos mesmos não foi capaz de aumentar a proteção observada em relação aos animais imunizados com os plasmídeos individualmente.

10. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K., K. M. MURPHY, AND A. SHER. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.
- AFRIN, F., AND N. ALI. 1997. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun* 65:2371-2377.
- AGRAWAL, S., AND E. R. KANDIMALLA. 2002. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med* 8:114-121.
- AGUILAR-BE, I., R. DA SILVA ZARDO, E. PARAGUAI DE SOUZA, G. P. BORJA-CABRERA, M. ROSADO-VALLADO, M. MUT-MARTIN, R. GARCIA-MISS MDEL, C. B. PALATNIK DE SOUSA, AND E. DUMONTEIL. 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 73:812-819.
- AHMED, S., M. COLMENARES, L. SOONG, K. GOLDSMITH-PESTANA, L. MUNSTERMANN, R. MOLINA, AND D. MCMAHON-PRATT. 2003. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 71:401-410.
- ALBERT, M. L., B. SAUTER, AND N. BHARDWAJ. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-89.
- ALEXANDER, J., G. H. COOMBS, AND J. C. MOTTRAM. 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 161:6794-6801.
- ALIBERTI, J., AND A. BAFICA. 2005. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:283-288.
- ALIBERTI, J., J. P. VIOLA, A. VIEIRA-DE-ABREU, P. T. BOZZA, A. SHER, AND J. SCHARFSTEIN. 2003. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* 170:5349-5353.
- AL-QAHTANI, A., M. TEILHET, AND K. MENSA-WILMOT. 1998. Species-specificity in endoplasmic reticulum signal peptide utilization revealed by proteins from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*. *Biochem J* 331 (Pt 2):521-529.
- ALVAR, J., R. MOLINA, M. SAN ANDRES, M. TESOURO, J. NIETO, M. VITUTIA, F. GONZALEZ, M. D. SAN ANDRES, J. BOGGIO, F. RODRIGUEZ, AND ET AL. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 88:371-378.
- ANDERSON, J. M., F. OLIVEIRA, S. KAMHAWI, B. J. MANS, D. REYNOSO, A. E. SEITZ, P. LAWYER, M. GARFIELD, M. PHAM, AND J. G. VALENZUELA. 2006.

Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7:52.

ANDRADE, B. B., C. I. DE OLIVEIRA, C. I. BRODSKYN, A. BARRAL, AND M. BARRAL-NETTO. 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66:122-127.

ANJILI, C. O., P. A. MBATI, R. W. MWANGI, J. I. GITHURE, J. O. OLOBO, L. L. ROBERT, AND D. K. KOECH. 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop* 60:97-100.

ANSARI, N. A., S. SALUJA, AND P. SALOTRA. 2006. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol* 119:339-345.

ANSARI, N. A., V. RAMESH, AND P. SALOTRA. 2006. Interferon (IFN)-gamma , tumor necrosis factor-alpha , interleukin-6, and IFN-gamma receptor 1 are the major immunological determinants associated with post-kala azar dermal leishmaniasis. *J Infect Dis* 194:958-965.

ANSTEAD, G. M., B. CHANDRASEKAR, W. ZHAO, J. YANG, L. E. PEREZ, AND P. C. MELBY. 2001. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 69:4709-4718.

APARICIO, I. M., J. SCHARFSTEIN, AND A. P. LIMA. 2004. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypanomastigote membranes. *Infect Immun* 72:5892-5902.

APPELBERG, R. 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 15:87-92.

ASAHINA, A., AND K. TAMAKI. 2006. Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J Dermatol Sci* 44:1-9.

AWASTHI, A., R. K. MATHUR, AND B. SAHA. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119:238-258.

AZEVEDO, V., G. LEVITUS, A. MIYOSHI, A. L. CANDIDO, A. M. GOES, AND S. C. OLIVEIRA. 1999. Main features of DNA-based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res* 32:147-153.

BABIUK, S., M. BACA-ESTRADA, L. A. BABIUK, C. EWEN, AND M. FOLDVARI. 2000. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. *J Control Release* 66:199-214.

BABIUK, S., N. MOOKHERJEE, R. PONTAROLLO, P. GRIEBEL, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, R. HECKER, AND L. BABIUK. 2004. TLR9-

l- and TLR9^{+/+} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* 113:114-120.

BAHIA, D., N. F. GONTIJO, I. R. LEON, J. PERALES, M. H. PEREIRA, G. OLIVEIRA, R. CORREA-OLIVEIRA, AND A. B. REIS. 2007. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res* 100:449-454.

BALARAMAN, S., P. TEWARY, V. K. SINGH, AND R. MADHUBALA. 2004. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem Biophys Res Commun* 317:639-647.

BARBI, J., S. OGHUMU, L. E. ROSAS, T. CARLSON, B. LU, C. GERARD, C. M. LEZAMA-DAVILA, AND A. R. SATOSKAR. 2007. Lack of CXCR3 delays the development of hepatic inflammation but does not impair resistance to *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 195:1713-1717.

BARBIERI, C. L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28:329-337.

BARBOSA JUNIOR, A. A., Z. A. ANDRADE, AND S. G. REED. 1987. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Braz J Med Biol Res* 20:63-72.

BAROUCH, D. H., N. L. LETVIN, AND R. A. SEDER. 2004. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol Rev* 202:266-274.

BARRAL, A., D. PEDRAL-SAMPAIO, G. GRIMALDI JUNIOR, H. MOMEN, D. MCMAHON-PRATT, A. RIBEIRO DE JESUS, R. ALMEIDA, R. BADARO, M. BARRAL-NETTO, E. M. CARVALHO, AND ET AL. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44:536-546.

BARRAL, A., E. HONDA, A. CALDAS, J. COSTA, V. VINHAS, E. D. ROWTON, J. G. VALENZUELA, R. CHARLAB, M. BARRAL-NETTO, AND J. M. RIBEIRO. 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62:740-745.

BARRAL, A., M. BARRAL-NETTO, E. C. YONG, C. E. BROWNELL, D. R. TWARDZIK, AND S. G. REED. 1993. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3442-3446.

BARRAL, A., M. TEIXEIRA, P. REIS, V. VINHAS, J. COSTA, H. LESSA, A. L. BITTENCOURT, S. REED, E. M. CARVALHO, AND M. BARRAL-NETTO. 1995. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 147:947-954.

BARRAL-NETTO, M., AND A. BARRAL. 1994. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 27:1-9.

- BARRAL-NETTO, M., R. BADARO, A. BARRAL, R. P. ALMEIDA, S. B. SANTOS, F. BADARO, D. PEDRAL-SAMPAIO, E. M. CARVALHO, E. FALCOFF, AND R. FALCOFF. 1991. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 163:853-857.
- BASTOS, K. R., C. R. MARINHO, R. BARBOZA, M. RUSSO, J. M. ALVAREZ, AND M. R. D'IMPERIO LIMA. 2004. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect* 6:630-636.
- a-BASU, R., S. BHAUMIK, A. K. HALDAR, K. NASKAR, T. DE, S. K. DANA, P. WALDEN, AND S. ROY. 2007. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting strong CD8+CTL response with concomitant suppression of IL-10 but not IL-4 and IL-13. *Infect Immun*.
- BASU, R., S. BHAUMIK, J. M. BASU, K. NASKAR, T. DE, AND S. ROY. 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174:7160-7171.
- b-BASU, R., S. ROY, AND P. WALDEN. 2007. HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *J Infect Dis* 195:1373-1380.
- BELKAID, Y., J. G. VALENZUELA, S. KAMHAWI, E. ROWTON, D. L. SACKS, AND J. M. RIBEIRO. 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6704-6709.
- BELKAID, Y., S. MENDEZ, R. LIRA, N. KADAMBI, G. MILON, AND D. SACKS. 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. *J Immunol* 165:969-977.
- BERBERICH, C., J. R. RAMIREZ-PINEDA, C. HAMBRECHT, G. ALBER, Y. A. SKEIKY, AND H. MOLL. 2003. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170:3171-3179.
- BEZERRA, H. S., AND M. J. TEIXEIRA. 2001. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:349-351.
- BHATT, K., AND P. SALGAME. 2007. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 27:347-362.

BIEBER, T. 2007. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1). *Immunobiology* 212:499-503.

BODEY, B., B. BODEY, JR., AND H. E. KAISER. 1997. Dendritic type, accessory cells within the mammalian thymic microenvironment. Antigen presentation in the dendritic neuro-endocrine-immune cellular network. *In Vivo* 11:351-370.

BOGDAN, C., N. DONHAUSER, R. DORING, M. ROLLINGHOFF, A. DIEFENBACH, AND M. G. RITTIG. 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191:2121-2130.

BOZZA, M., M. B. SOARES, P. T. BOZZA, A. R. SATOSKAR, T. G. DIACOVO, F. BROMBACHER, R. G. TITUS, C. B. SHOEMAKER, AND J. R. DAVID. 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol* 28:3120-3127.

BRODSKYN, C., C. I. DE OLIVEIRA, A. BARRAL, AND M. BARRAL-NETTO. 2003. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2:705-717.

BUATES, S., AND G. MATLASHEWSKI. 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 166:3416-3422.

BUENO, R., M. N. MELLO, C. A. MENEZES, W. O. DUTRA, AND R. L. SANTOS. 2005. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:521-524.

CALDAS, A. J., J. COSTA, D. AQUINO, A. A. SILVA, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2006. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? *Acta Trop* 97:252-258.

CALDAS, A., C. FAVALI, D. AQUINO, V. VINHAS, J. VAN WEYENBERGH, C. BRODSKYN, J. COSTA, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5:113.

CAMERON, P., A. MCGACHY, M. ANDERSON, A. PAUL, G. H. COOMBS, J. C. MOTTRAM, J. ALEXANDER, AND R. PLEVIN. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 173:3297-3304.

CAMPOS-MARTIN, Y., M. COLMENARES, B. GOZALBO-LOPEZ, M. LOPEZ-NUNEZ, P. B. SAVAGE, AND E. MARTINEZ-NAVES. 2006. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J Immunol* 176:6172-6179.

- CAMPOS-NETO, A. 2005. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res* 38:979-984.
- CARDOSO, L. F. NETO, J. C. SOUSA, M. RODRIGUES, AND M. CABRAL. 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79:213-220.
- CARRION, J., A. NIETO, M. SOTO, AND C. ALONSO. 2007. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Microbes Infect* 9:735-743.
- CARTER, K. C., F. L. HENRIQUEZ, S. A. CAMPBELL, C. W. ROBERTS, A. NOK, A. B. MULLEN, AND E. MCFARLANE. 2007. DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection. *Vaccine* 25:4502-4509.
- CARVALHAL, D. G., A. BARBOSA, JR., M. D'EL-REI HERMIDA, J. CLARENCIO, N. F. PINHEIRO, JR., P. S. VERAS, AND W. L. DOS-SANTOS. 2004. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol* 107:189-199.
- CARVALHO, L. P., S. PASSOS, W. O. DUTRA, M. SOTO, C. ALONSO, K. J. GOLLOB, E. M. CARVALHO, AND A. RIBEIRO DE JESUS. 2005. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61:337-342.
- CASARES, S., K. INABA, T. D. BRUMEANU, R. M. STEINMAN, AND C. A. BONA. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 186:1481-1486.
- CHAKRABORTY, D., S. BANERJEE, A. SEN, K. K. BANERJEE, P. DAS, AND S. ROY. 2005. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175:3214-3224.
- CHAMPAGNE, D. E. 1994. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitol Today* 10:430-433.
- CHANG, K. P., S. G. REED, B. S. MCGWIRE, AND L. SOONG. 2003. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* 85:375-390.
- CHARLAB, R., E. D. ROWTON, AND J. M. RIBEIRO. 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol* 95:45-53.
- CHEN, L., Z. H. ZHANG, T. WATANABE, T. YAMASHITA, T. KOBAYAKAWA, A. KANEKO, H. FUJIWARA, AND F. SENDO. 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int* 54:109-118.

- CHEN, M., L. P. ANDERSEN, L. ZHAI, AND A. KHARAZMI. 1999. Characterization of the respiratory chain of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24:169-174.
- CHILDS, G. E., L. K. LIGHTNER, L. MCKINNEY, M. G. GROVES, E. E. PRICE, AND L. D. HENDRICKS. 1984. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol* 78:25-34.
- CIARAMELLA, P., G. OLIVA, R. D. LUNA, L. GRADONI, R. AMBROSIO, L. CORTESE, A. SCALONE, AND A. PERSECHINO. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141:539-543.
- COLER, R. N., Y. GOTO, L. BOGATZKI, V. RAMAN, AND S. G. REED. 2007. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75:4648-4654.
- COOPER, A. M., AND S. A. KHADER. 2007. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 28:33-38.
- COSTA, D. J., C. FAVALI, J. CLARENCIO, L. AFONSO, V. CONCEICAO, J. C. MIRANDA, R. G. TITUS, J. VALENZUELA, M. BARRAL-NETTO, A. BARRAL, AND C. I. BRODSKYN. 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72:1298-1305.
- COX, F. E. 1997. Designer vaccines for parasitic diseases. *Int J Parasitol* 27:1147-1157.
- CRUZ, A., C. M. COBURN, AND S. M. BEVERLEY. 1991. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7170-7174.
- CRUZ I, NIETO J, MORENO J, CAÑAVATE C, DESJEUX P, ALVAR J. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Medical Res*. Mar;123(3):357-88
- CUNNINGHAM, A.C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp. Mol. Pathol.* Apr;72(2):132-41
- DA SILVA, V. O., G. P. BORJA-CABRERA, N. N. CORREIA PONTES, E. P. DE SOUZA, K. G. LUZ, M. PALATNIK, AND C. B. PALATNIK DE SOUSA. 2000. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 19:1082-1092.
- DA-CRUZ, A. M., F. CONCEICAO-SILVA, A. L. BERTHO, AND S. G. COUTINHO. 1994. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:2614-2618.

DA-CRUZ, A. M., R. BITTAR, M. MATTOS, M. P. OLIVEIRA-NETO, R. NOGUEIRA, V. PINHO-RIBEIRO, R. B. AZEREDO-COUTINHO, AND S. G. COUTINHO. 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:251-256.

DALOD, M., T. P. SALAZAR-MATHER, L. MALMGAARD, C. LEWIS, C. ASSELIN-PATUREL, F. BRIERE, G. TRINCHIERI, AND C. A. BIRON. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195:517-528.

DANESHVAR, H., G. H. COOMBS, P. HAGAN, AND R. S. PHILLIPS. 2003. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. *J Infect Dis* 187:1662-1668.

DE ALMEIDA, M. C., S. A. CARDOSO, AND M. BARRAL-NETTO. 2003. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 33:153-162.

DE MOURA, T. R., F. O. NOVAIS, F. OLIVEIRA, J. CLARENCIO, A. NORONHA, A. BARRAL, C. BRODSKYN, AND C. I. DE OLIVEIRA. 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73:5827-5834.

DE MOURA, T. R., F. OLIVEIRA, F. O. NOVAIS, J. C. MIRANDA, J. CLARENCIO, I. FOLLADOR, E. M. CARVALHO, J. G. VALENZUELA, M. BARRAL-NETTO, A. BARRAL, C. BRODSKYN, AND C. I. DE OLIVEIRA. 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. *PLoS Negl Trop Dis* 1:e84.

DELGADO, G., C. A. PARRA-LOPEZ, L. E. VARGAS, R. HOYA, M. ESTUPINAN, F. GUZMAN, A. TORRES, C. ALONSO, I. D. VELEZ, C. SPINEL, AND M. E. PATARROYO. 2003. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* 25:199-209.

DENISE, H., K. MCNEIL, D. R. BROOKS, J. ALEXANDER, G. H. COOMBS, AND J. C. MOTTRAM. 2003. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun* 71:3190-3195.

DIAS COSTA, J., M. DE NAZARETH MEIRELLES, C. EDUARDO PEREIRA VELLOSO, AND R. PORROZZI. 2007. *Leishmania chagasi*: cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. *Exp Parasitol* 117:390-398.

DIEZ, H., M. C. LOPEZ, M. DEL CARMEN THOMAS, F. GUZMAN, F. ROSAS, V. VELAZCO, J. M. GONZALEZ, AND C. PUERTA. 2006. Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 28:101-105.

DISCH, J., M. C. OLIVEIRA, M. ORSINI, AND A. RABELLO. 2004. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 92:279-283.

DOMINGUEZ, M., AND A. TORANO. 1999. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med* 189:25-35.

DONDJI, B., E. PEREZ-JIMENEZ, K. GOLDSMITH-PESTANA, M. ESTEBAN, AND D. MCMAHON-PRATT. 2005. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73:5286-5289.

DONNELLY, K. B., H. C. LIMA, AND R. G. TITUS. 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. *J Parasitol* 84:97-103.

DUMONTEIL, E. 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol* 2007:90520.

ENGWERDA, C. R., AND P. M. KAYE. 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21:73-78.

EVANS, T. G., L. THAI, D. L. GRANGER, AND J. B. HIBBS, JR. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151:907-915.

FARAH, F. S., AND J. A. MALAK. 1971. Cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol* 103:467-474.

FAVALI, C., D. COSTA, L. AFONSO, V. CONCEICAO, A. ROSATO, F. OLIVEIRA, J. COSTA, A. BARRAL, M. BARRAL-NETTO, AND C. I. BRODSKYN. 2005. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 7:86-92.

FERGUSON, M. A., J. S. BRIMACOMBE, S. COTTAZ, R. A. FIELD, L. S. GUTHER, S. W. HOMANS, M. J. MCCONVILLE, A. MEHLERT, K. G. MILNE, J. E. RALTON, AND ET AL. 1994. Glycosyl-phosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. *Parasitology* 108 Suppl:S45-54.

FERNANDEZ-GUERRERO, M. L., P. ROBLES, P. RIVAS, F. MOJER, G. MUNIZ, AND M. DE GORGOLAS. 2004. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop* 90:11-16.

FUERTES, M. A., C. BERBERICH, R. M. LOZANO, G. GIMENEZ-GALLEGO, AND C. ALONSO. 1999. Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 260:559-567.

- FUJIWARA, R. T., A. M. VALE, J. C. FRANCA DA SILVA, R. T. DA COSTA, S. QUETZ, J. D. A. O. A. MARTINS FILHO, A. B. REIS, R. CORREA OLIVEIRA, G. L. MACHADO-COELHO, L. L. BUENO, J. M. BETHONY, G. FRANK, E. NASCIMENTO, O. GENARO, W. MAYRINK, S. REED, AND A. CAMPOS-NETO. 2005. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LelF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36:827-838.
- FULLER DH, SHIPLEY T, ALLEN TM, FULLER JT, WU MS, HORTON H, WILSON N, WIDERA G, WATKINS DI. 2007. Immunogenicity of hybrid DNA vaccines expressing hepatitis B core particles carrying human and simian immunodeficiency virus epitopes in mice and rhesus macaques. *Virology*. Aug 1:364(2):245-55. Epub 2007 Apr 11
- FYNAN, E. F., R. G. WEBSTER, D. H. FULLER, J. R. HAYNES, J. C. SANTORO, AND H. L. ROBINSON. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11478-11482.
- GAFUROV, I. M. 1999. [Experience in controlling and preventing zoonotic cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan]. *Med Parazitol (Mosk)*:58-59.
- GANTT, K. R., S. SCHULTZ-CHERRY, N. RODRIGUEZ, S. M. JERONIMO, E. T. NASCIMENTO, T. L. GOLDMAN, T. J. RECKER, M. A. MILLER, AND M. E. WILSON. 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170:2613-2620.
- GANTT, K. R., T. L. GOLDMAN, M. L. MCCORMICK, M. A. MILLER, S. M. JERONIMO, E. T. NASCIMENTO, B. E. BRITIGAN, AND M. E. WILSON. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 167:893-901.
- GARG, R., AND A. DUBE. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123:439-454.
- GARMORY, H. S., S. D. PERKINS, R. J. PHILLPOTTS, AND R. W. TITBALL. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1343-1361.
- GIFAWESEN, C., AND J. P. FARRELL. 1989. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* 57:3091-3096.
- GILLESPIE, R. D., M. L. MBOW, AND R. G. TITUS. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22:319-331.
- GIUNCHETTI, R. C., A. B. REIS, D. DA SILVEIRA-LEMONS, O. A. MARTINS-FILHO, R. CORREA-OLIVEIRA, J. BETHONY, A. M. VALE, J. DA SILVA QUETZ, L. L. BUENO, J. C. FRANCA-SILVA, E. NASCIMENTO, W. MAYRINK, AND R. T. FUJIWARA. 2007. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci*.

GOMES, D. C., E. F. PINTO, I. D. DE MELO, W. P. LIMA, V. LARRAGA, U. G. LOPES, AND B. ROSSI-BERGMANN. 2007. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25:2168-2172.

GOMES, N. A., V. BARRETO-DE-SOUZA, AND G. A. DOSREIS. 2000. Early in vitro priming of distinct T(h) cell subsets determines polarized growth of visceralizing *Leishmania* in macrophages. *Int Immunol* 12:1227-1233.

GOMES, R. B., C. BRODSKYN, C. I. DE OLIVEIRA, J. COSTA, J. C. MIRANDA, A. CALDAS, J. G. VALENZUELA, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2002. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186:1530-1534.

GOMES R, TEIXEIRA C, TEIXEIRA MJ, OLIVEIRA F, MENEZES MJ, SILVA C, DE OLIVEIRA CI, MIRANDA JC, ELNAIEM DE, KAMHAWI S, VALENZUELA JG, BRODSKYN CI. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 3;105(22):7845-50.

GOMES-PEREIRA, S., O. R. RODRIGUES, AND G. M. SANTOS-GOMES. 2004. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 95:63-70.

GORDON, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.

GRANUCCI, F., C. VIZZARDELLI, N. PAVELKA, S. FEAU, M. PERSICO, E. VIRZI, M. RESCIGNO, G. MORO, AND P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2:882-888.

GREEN, S. J., L. F. SCHELLER, M. A. MARLETTA, M. C. SEGUIN, F. W. KLOTZ, M. SLAYTER, B. J. NELSON, AND C. A. NACY. 1994. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett* 43:87-94.

GREENLAND JR, LETVIN NL. 2007. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*. May 10;25(19):3731-41. Epub 2007 Feb 20.

GUARGA, J. L., J. MORENO, J. LUCIENTES, M. J. GRACIA, M. A. PERIBANEZ, AND J. A. CASTILLO. 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 88:13-20.

GUERMONPREZ, P., J. VALLADEAU, L. ZITVOGEL, C. THERY, AND S. AMIGORENA. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.

GUILPIN, V. O., C. SWARDSON-OLVER, L. NOSBISCH, AND R. G. TITUS. 2002. Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437-446.

HAILU, A., T. VAN DER POLL, N. BERHE, AND P. A. KAGER. 2004. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 71:561-567.

HALL, L. R., AND R. G. TITUS. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155:3501-3506.

HARIZI, H., AND N. GUALDE. 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 65:507-514.

HATTORI, Y., S. KAWAKAMI, Y. LU, K. NAKAMURA, F. YAMASHITA, AND M. HASHIDA. 2006. Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration. *J Gene Med* 8:824-834.

HENNINO, A., M. VOCANSON, Y. TOUSSAINT, K. RODET, J. BENETIERE, A. M. SCHMITT, M. F. ARIES, F. BERARD, A. ROZIERES, AND J. F. NICOLAS. 2007. Skin-infiltrating CD8+ T cells initiate atopic dermatitis lesions. *J Immunol* 178:5571-5577.

HENRI, S., J. CURTIS, H. HOCHREIN, D. VREMEC, K. SHORTMAN, AND E. HANDMAN. 2002. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 70:3874-3880.

HILDEMAN, D. A. 2004. Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36:1496-1504.

HIMMELRICH, H., P. LAUNOIS, I. MAILLARD, T. BIEDERMANN, F. TACCHINI-COTTIER, R. M. LOCKSLEY, M. ROCKEN, AND J. A. LOUIS. 2000. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 164:4819-4825.

HILKENS, C., A. SNIJDERS, H. VERMEULEN, P. VAN DER MEIDE, E. WIERENGA, AND M. KAPSENBERG. 1996. Accessory cell-derived interleukin-12 and prostaglandin E2 determine the level of interferon-gamma produced by activated human CD4+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 795

HIRAO, L. A., L. WU, A. S. KHAN, A. SATISHCHANDRAN, R. DRAGHIA-AKLI, AND D. B. WEINER. 2008. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 26:440-448.

HOMMEL, M., C. L. JAFFE, B. TRAVI, AND G. MILON. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1:55-73.

- HOWARD, J. G., C. HALE, AND W. L. CHAN-LIEW. 1980. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. I. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. *Parasite Immunol* 2:303-314.
- HOWARD M. O'GARRA A, ISHIDA H, DE WAAL MALEFYT R, DE VRIES J. 1992. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol*. Jul;12(4):239-47
- HU, H., X. LU, L. TAO, B. BAI, Z. ZHANG, Y. CHEN, F. ZHENG, J. CHEN, Z. CHEN, AND H. WANG. 2007. Induction of specific immune responses by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike DNA vaccine with or without interleukin-2 immunization using different vaccination routes in mice. *Clin Vaccine Immunol* 14:894-901.
- HUNSAKER, B. D., AND L. J. PERINO. 2001. Efficacy of intradermal vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 79:1-13.
- HUNTER, C. A., A. VILLARINO, D. ARTIS, AND P. SCOTT. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev* 202:106-114.
- HUSTER, K. M., C. STEMBERGER, AND D. H. BUSCH. 2006. Protective immunity towards intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 18:458-464.
- IBORRA, S., J. CARRION, C. ANDERSON, C. ALONSO, D. SACKS, AND M. SOTO. 2005. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun* 73:5842-5852.
- INDIANI DE OLIVEIRA, C., M. J. TEIXEIRA, C. R. TEIXEIRA, J. RAMOS DE JESUS, A. BOMURA ROSATO, J. SANTA DA SILVA, C. BRODSKYN, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6:977-984.
- ITANO, A. A., AND M. K. JENKINS. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4:733-739.
- IVORY, C., AND K. CHADEE. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther* 2:17.
- JANEWAY, C. A., JR., AND R. MEDZHITOV. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- JARDIM, A., S. HANSON, B. ULLMAN, W. D. MCCUBBIN, C. M. KAY, AND R. W. OLAFSON. 1995. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J* 305 (Pt 1):315-320.

- JARDIM, A., V. FUNK, R. M. CAPRIOLI, AND R. W. OLAFSON. 1995. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305 (Pt 1):307-313.
- JUNG, S., D. UNUTMAZ, P. WONG, G. SANO, K. DE LOS SANTOS, T. SPARWASSER, S. WU, S. VUTHOORI, K. KO, F. ZAVALA, E. G. PAMER, D. R. LITTMAN, AND R. A. LANG. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- KAMHAWI, S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2:1765-1773.
- KARP, C. L., S. H. EL-SAFI, T. A. WYNN, M. M. SATTI, A. M. KORDOFANI, F. A. HASHIM, M. HAG-ALI, F. A. NEVA, T. B. NUTMAN, AND D. L. SACKS. 1993. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 91:1644-1648.
- KATO, H., R. C. JOCHIM, P. G. LAWYER, AND J. G. VALENZUELA. 2007. Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan Africa. *J Exp Biol* 210:733-740.
- KATZ, O., J. N. WAITUMBI, R. ZER, AND A. WARBURG. 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 62:145-150.
- KAYE, P. M., M. SVENSSON, M. ATO, A. MAROOF, R. POLLEY, S. STAGER, S. ZUBAIRI, AND C. R. ENGWERDA. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201:239-253.
- KAYE, P. M., P. GORAK, M. MURPHY, AND S. ROSS. 1995. Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1:75-81.
- KEMP, M., J. A. KURTZHALS, K. BENDTZEN, L. K. POULSEN, M. B. HANSEN, D. K. KOECH, A. KHARAZMI, AND T. G. THEANDER. 1993. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 61:1069-1073.
- KENNEY, R. T., D. L. SACKS, A. A. GAM, H. W. MURRAY, AND S. SUNDAR. 1998. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. *J Infect Dis* 177:815-818.
- KHALIL, E. A., N. B. AYED, A. M. MUSA, M. E. IBRAHIM, M. M. MUKHTAR, E. E. ZIJLSTRA, I. M. ELHASSAN, P. G. SMITH, P. M. KIENY, H. W. GHALIB, F. ZICKER, F. MODABBER, AND A. M. ELHASSAN. 2005. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 140:349-353.

KHAMESIPOUR, A., S. RAFATI, N. DAVOUDI, F. MABOUDI, AND F. MODABBER. 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123:423-438.

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

LANZARO, G. C., A. H. LOPES, J. M. RIBEIRO, C. B. SHOEMAKER, A. WARBURG, M. SOARES, AND R. G. TITUS. 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Insect Mol Biol* 8:267-275.

LEE, D., B. S. GRAHAM, Y. L. CHIU, P. B. GILBERT, M. J. MCEL RATH, R. B. BELSHE, S. P. BUCHBINDER, H. W. SHEPPARD, B. A. KOBLIN, K. H. MAYER, M. C. KEEFER, M. J. MULLIGAN, AND C. L. CELUM. 2004. Breakthrough infections during phase 1 and 2 prime-boost HIV-1 vaccine trials with canarypox vectors (ALVAC) and booster dose of recombinant gp120 or gp160. *J Infect Dis* 190:903-907.

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

LEMESRE, J. L., P. HOLZMULLER, R. B. GONCALVES, G. BOURDOISEAU, C. HUGNET, M. CAVALEYRA, AND G. PAPIEROK. 2007. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25:4223-4234.

LERNER, E. A., AND C. B. SHOEMAKER. 1992. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267:1062-1066.

LERNER, E. A., J. M. RIBEIRO, R. J. NELSON, AND M. R. LERNER. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266:11234-11236.

LIEW, F. Y., S. MILLOTT, C. PARKINSON, R. M. PALMER, AND S. MONCADA. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144:4794-4797.

LIMA, H. C., AND R. G. TITUS. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64:5442-5445.

LIMA, W. G., P. S. OLIVEIRA, M. V. CALIARI, R. GONCALVES, M. S. MICHALICK, M. N. MELO, W. L. TAFURI, AND W. L. TAFURI. 2007. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally

- infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 117:129-136.
- LINDOSO, J. A., P. C. COTRIM, AND H. GOTO. 2004. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 34:1-4.
- MAKINO, M., Y. MAEDA, Y. FUKUTOMI, AND T. MUKAI. 2007. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes Infect* 9:70-77.
- MARQUES N. CABRAL S, SÁ R. COELHO F, OLIVEIRA J, SARAIVA DA CUNHA JG, MELIÇO SILVESTRE A. 2007. Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era. *Acta Med. Port.* Jul-Aug:20(4):291-8. Epub 2007 Nov 15.
- MASCARENHAS, R. E., C. BRODSKYN, G. BARBOSA, J. CLARENCIO, A. S. ANDRADE-FILHO, F. FIGUEIROA, B. GALVAO-CASTRO, AND F. GRASSI. 2006. Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. *Clin Vaccine Immunol* 13:547-552.
- MATHIAS, R., F. A. COSTA, AND H. GOTO. 2001. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 34:539-543.
- MATTE, C., G. MAION, W. MOURAD, AND M. OLIVIER. 2001. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* 23:177-184.
- MAUEL, J. 1990. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J Leukoc Biol* 47:187-193.
- MAUEL, J., A. RANSIJN, AND Y. BUCHMULLER-ROUILLER. 1991. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol* 49:73-82.
- MAURER, M., S. LOPEZ KOSTKA, F. SIEBENHAAR, K. MOELLE, M. METZ, J. KNOP, AND E. VON STEBUT. 2006. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *Faseb J* 20:2460-2467.
- MAURICIO, I. L., J. R. STOTHARD, AND M. A. MILES. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16:188-189.
- MAZUMDER, S., R. RAVINDRAN, A. BANERJEE, AND N. ALI. 2007. Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine* 25:8771-8781.
- MBOW, M. L., J. A. BLEYENBERG, L. R. HALL, AND R. G. TITUS. 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-

- regulates a Th2. response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 161:5571-5577.
- MCCLUSKIE, M. J., AND H. L. DAVIS. 1999. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Microbes Infect* 1:685-698.
- MCLACHLAN, J. B., AND M. K. JENKINS. 2007. Migration and accumulation of effector CD4+ T cells in nonlymphoid tissues. *Proc Am Thorac Soc* 4:439-442.
- MCPMAHON-PRATT, D., AND J. ALEXANDER. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev* 201:206-224.
- MELBY, P. C., A. TABARES, B. I. RESTREPO, A. E. CARDONA, H. S. MCGUFF, AND J. M. TEALE. 2001. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 99:17-25.
- MELBY, P. C., B. CHANDRASEKAR, W. ZHAO, AND J. E. COE. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166:1912-1920.
- MELBY, P. C., V. V. TRYON, B. CHANDRASEKAR, AND G. L. FREEMAN. 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66:2135-2142.
- MENDEZ, S., Y. BELKAID, R. A. SEDER, AND D. SACKS. 2002. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20:3702-3708.
- MOLL, H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 14:383-387.
- MORENO, J., AND J. ALVAR. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18:399-405.
- MORENO, J., J. NIETO, S. MASINA, C. CANAVATE, I. CRUZ, C. CHICHARRO, E. CARRILLO, S. NAPP, C. REYMOND, P. M. KAYE, D. F. SMITH, N. FASEL, AND J. ALVAR. 2007. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25:5290-5300.
- MORRIS, R. V., C. B. SHOEMAKER, J. R. DAVID, G. C. LANZARO, AND R. G. TITUS. 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167:5226-5230.
- MUKHOPADHYAY, S., P. SEN, S. BHATTACHARYYA, S. MAJUMDAR, AND S. ROY. 1999. Immunoprophylaxis and immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 17:291-300.

MURPHY, M. L., S. E. COTTERELL, P. M. GORAK, C. R. ENGWERDA, AND P. M. KAYE. 1998. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen. *Leishmania donovani*. *J Immunol* 161:4153-4160.

MURRAY, H. W. 2000. Mononuclear cell recruitment, granuloma assembly, and response to treatment in experimental visceral leishmaniasis: intracellular adhesion molecule 1-dependent and -independent regulation. *Infect Immun* 68:6294-6299.

MURRAY, H. W. 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82:249-267.

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

MURRAY, H. W., K. E. SQUIRES, C. D. MIRALLES, M. Y. STOECKLE, A. M. GRANGER, A. GRANELLI-PIPERNO, AND C. BOGDAN. 1992. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol* 148:1858-1863.

MURRAY, H. W., Z. XIANG, AND X. MA. 2006. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Am J Trop Med Hyg* 74:1013-1015.

NAKHAEI, A., T. TAHERI, M. TAGHIKHANI, M. MOHEBALI, A. H. SALMANIAN, N. FASEL, AND S. RAFATI. 2004. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol* 119:107-123.

NEAL, R. A., AND C. HALE. 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. *Parasitology* 87 (Pt 1):7-13.

NEWMAN, K. C., AND E. M. RILEY. 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7:279-291.

NISS, J. H., S. BRAND, X. GU, L. LANDSMAN, S. JUNG, B. A. MCCORMICK, J. M. VYAS, M. BOES, H. L. PLOEGH, J. G. FOX, D. R. LITTMAN, AND H. C. REINECKER. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.

NOEL, W., G. RAES, G. HASSANZADEH GHASSABEH, P. DE BAETSELIER, AND A. BESCHIN. 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* 20:126-133.

NORSWORTHY, N. B., J. SUN, D. ELNAIEM, G. LANZARO, AND L. SOONG. 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun* 72:1240-1247.

NYLEN, S., AND D. SACKS. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28:378-384.

NYLEN, S., R. MAURYA, L. EIDSMO, K. D. MANANDHAR, S. SUNDAR, AND D. SACKS. 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 204:805-817.

OLIVEIRA, F., S. KAMHAWI, A. E. SEITZ, V. M. PHAM, P. M. GUIGAL, L. FISCHER, J. WARD, AND J. G. VALENZUELA. 2006. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24:374-390.

OLIVEIRA, M. A., C. E. TADOKORO, G. M. LIMA, T. MOSCA, L. Q. VIEIRA, P. J. LEENEN, AND I. A. ABRAHAMSOHN. 2005. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. *Microbes Infect* 7:213-223.

OLIVEIRA, S. C., G. M. ROSINHA, C. F. DE-BRITO, C. T. FONSECA, R. R. AFONSO, M. C. COSTA, A. M. GOES, E. L. RECH, AND V. AZEVEDO. 1999. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz J Med Biol Res* 32:207-214.

OLIVIER, M., D. J. GREGORY, AND G. FORGET. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18:293-305.

OSWALD IP, WYNN TA, SHER A, JAMES SL. 1992. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;89(18):8676-80.

OZINSKY, A., D. M. UNDERHILL, J. D. FONTENOT, A. M. HAJJAR, K. D. SMITH, C. B. WILSON, L. SCHROEDER, AND A. ADEREM. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13766-13771.

PAIVA, B. R., N. F. SECUNDINO, J. C. NASCIMENTO, P. F. PIMENTA, E. A. GALATI, H. F. JUNIOR, AND R. S. MALAFRANTE. 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 99:252-259.

PAPADOPOULOU, B., G. ROY, M. BRETON, C. KUNDIG, C. DUMAS, I. FILLION, A. K. SINGH, M. OLIVIER, AND M. OUELLETTE. 2002. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioperin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70:62-68.

PARANHOS-SILVA, M., G. G. OLIVEIRA, E. A. REIS, R. M. DE MENEZES, O. FERNANDES, I. SHERLOCK, R. B. GOMES, L. C. PONTES-DE-CARVALHO,

AND W. L. DOS-SANTOS. 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol* 114:97-111.

PASTORINO, A. C., C. M. JACOB, G. W. OSELKA, AND M. M. CARNEIRO-SAMPAIO. 2002. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. *J Pediatr (Rio J)* 78:120-127.

PAVLENKO, M., A. K. ROOS, A. LUNDQVIST, A. PALMBORG, A. M. MILLER, V. OZENCI, B. BERGMAN, L. EGEVAD, M. HELLSTROM, R. KIESSLING, G. MASUCCI, P. WERSALL, S. NILSSON, AND P. PISA. 2004. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer* 91:688-694.

PEARSON, R. D., G. COX, T. EVANS, D. L. SMITH, D. WEIDEL, AND J. CASTRACANE. 1990. Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin 1 in experimental visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 43:640-649.

PEREZ, L. E., B. CHANDRASEKAR, O. A. SILDARRIAGA, W. ZHAO, L. T. ARTEAGA, B. L. TRAVI, AND P. C. MELBY. 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176:5519-5528.

PERUHYPE-MAGALHAES, V., O. A. MARTINS-FILHO, A. PRATA, A. SILVA LDE, A. RABELLO, A. TEIXEIRA-CARVALHO, R. M. FIGUEIREDO, S. F. GUIMARAES-CARVALHO, T. C. FERRARI, AND R. CORREA-OLIVEIRA. 2005. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol* 62:487-495.

PERUHYPE-MAGALHAES, V., O. A. MARTINS-FILHO, A. PRATA, A. SILVA LDE, A. RABELLO, A. TEIXEIRA-CARVALHO, R. M. FIGUEIREDO, S. F. GUIMARAES-CARVALHO, T. C. FERRARI, J. VAN WEYENBERGH, AND R. CORREA-OLIVEIRA. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146:124-132.

PETERS, N., AND D. SACKS. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213:159-179.

PHIPPS, R. P., S. H. STEIN, AND R. L. ROPER. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 12:349-352.

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

PINHEIRO, N. F., JR., M. D. HERMIDA, M. P. MACEDO, J. MENGEL, A. BAFICA, AND W. L. DOS-SANTOS. 2006. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 74:3912-3921.

PIPKIN, M. E., AND J. LIEBERMAN. 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19:301-308.

PLANELLES, L., M. C. THOMAS, C. ALONSO, AND M. C. LOPEZ. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun* 69:6558-6563.

POLLOCK, K. G., K. S. MCNEIL, J. C. MOTTRAM, R. E. LYONS, J. M. BREWER, P. SCOTT, G. H. COOMBS, AND J. ALEXANDER. 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 170:1746-1753.

PRIANTI, M. G., M. YOKOO, L. C. SALDANHA, F. A. COSTA, AND H. GOTO. 2007. *Leishmania (Leishmania) chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 40:819-823.

QURESHI, A. A., A. ASAHINA, M. OHNUMA, M. TAJIMA, R. D. GRANSTEIN, AND E. A. LERNER. 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* 54:665-671.

RAGHAVAN, S., AND J. HOLMGREN. 2005. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:121-127.

RAMA INIGUEZ, S., M. A. DEA-AYUELA, J. A. SANCHEZ-BRUNETE, J. J. TORRADO, J. M. ALUNDA, AND F. BOLAS-FERNANDEZ. 2006. Real-time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1195-1201.

RAMIREZ, J. R., C. BERBERICH, A. JARAMILLO, C. ALONSO, AND I. V. VELEZ. 1998. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:247-254.

RAMIREZ, J. R., K. GILCHRIST, S. ROBLEDO, J. C. SEPULVEDA, H. MOLL, D. SOLDATI, AND C. BERBERICH. 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* 20:455-461.

RAMOS, I., A. ALONSO, J. M. MARCEN, A. PERIS, J. A. CASTILLO, M. COLMENARES, AND V. LARRAGA. 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26:333-344.

- RANDOLPH, G. J., V. ANGELI, AND M. A. SWARTZ. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5:617-628.
- REINER, S. L., AND R. M. LOCKSLEY. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13:151-177.
- REIS E SOUSA, C., S. HIENY, T. SCHARTON-KERSTEN, D. JANKOVIC, H. CHAREST, R. N. GERMAIN, AND A. SHER. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186:1819-1829.
- RIBEIRO, J. M. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32:463-478.
- RIBEIRO, J. M. 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol* 69:104-106.
- RIBEIRO, J. M. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4:143-152.
- RIBEIRO, J. M., R. CHARLAB, AND J. G. VALENZUELA. 2001. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 204:2001-2010.
- RODRIGUES, C. A., L. F. BATISTA, M. C. TEIXEIRA, A. M. PEREIRA, P. O. SANTOS, G. G. DE SA OLIVEIRA, L. A. DE FREITAS, AND P. S. VERAS. 2007. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. *Vet Parasitol* 143:197-205.
- RODRIGUES, V., JR., J. SANTANA DA SILVA, AND A. CAMPOS-NETO. 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66:1233-1236.
- RODRIGUEZ-CORTES, A., A. OJEDA, L. LOPEZ-FUERTE, M. TIMON, L. ALTET, L. SOLANO-GALLEGO, E. SANCHEZ-ROBERT, O. FRANCINO, AND J. ALBEROLA. 2007. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25:7962-7971.
- ROGERS, K. A., AND R. G. TITUS. 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol* 25:127-134.
- ROGERS, K. A., G. K. DEKREY, M. L. MBOW, R. D. GILLESPIE, C. I. BRODSKYN, AND R. G. TITUS. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 209:1-7.

- ROGERS, M. E., T. ILG, A. V. NIKOLAEV, M. A. FERGUSON, AND P. A. BATES. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463-467.
- ROHOUSOVA, I., AND P. VOLF. 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol (Praha)* 53:161-171.
- ROHOUSOVA, I., S. OZENSOY, Y. OZBEL, AND P. VOLF. 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130:493-499.
- SACKS, D. L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 3:189-196.
- SACKS, D., AND C. ANDERSON. 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 201:225-238.
- SACKS D, NOBEN-TRAUTH N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. Nov;2(11):845-58
- SACKS, D., AND S. KAMHAWI. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55:453-483.
- SADICK, M. D., F. P. HEINZEL, B. J. HOLADAY, R. T. PU, R. S. DAWKINS, AND R. M. LOCKSLEY. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med* 171:115-127.]
- SAHA, S., S. MONDAL, A. BANERJEE, J. GHOSE, S. BHOWMICK, AND N. ALI. 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res* 123:245-266.
- SAKTHIANANDESWAREN, A., C. M. ELSO, K. SIMPSON, J. M. CURTIS, B. KUMAR, T. P. SPEED, E. HANDMAN, AND S. J. FOOTE. 2005. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15551-15556.
- SALAY, G., M. L. DORTA, N. M. SANTOS, R. A. MORTARA, C. BRODSKYN, C. I. OLIVEIRA, C. L. BARBIERI, AND M. M. RODRIGUES. 2007. Testing of Four *Leishmania* Vaccine Candidates in a Mouse Model of Infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the Main Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol* 14:1173-1181.
- SALDARRIAGA, O. A., B. L. TRAVI, W. PARK, L. E. PEREZ, AND P. C. MELBY. 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24:1928-1940.
- SAMUELSON, J., E. LERNER, R. TESH, AND R. TITUS. 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 173:49-54.

- SANTOS, W. R., V. M. DE LIMA, E. P. DE SOUZA, R. R. BERNARDO, M. PALATNIK, AND C. B. PALATNIK DE SOUSA. 2002. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21:30-43.
- Sartori, A., M. C. Roque-Barreira, J. Coe, and A. Campos-Neto. 1992. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. II: Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Clin Exp Immunol* 87:386-392.
- SCHARFSTEIN, J., V. SCHMITZ, V. MORANDI, M. M. CAPELLA, A. P. LIMA, A. MORROT, L. JULIANO, AND W. MULLER-ESTERL. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* 192:1289-1300.
- SCHRODER, N. W., AND M. MAURER. 2007. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy* 62:579-590.
- SCOTT, P., D. ARTIS, J. UZONNA, AND C. ZAPH. 2004. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev* 201:318-338.
- SELVAPANDIYAN, A., R. DUNCAN, A. DEBRABANT, N. LEE, G. SREENIVAS, P. SALOTRA, AND H. L. NAKHASI. 2006. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123:455-466.
- SERENO, D., A. CORDEIRO DA SILVA, F. MATHIEU-DAUDE, AND A. OUAISSI. 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 56:3-7.
- SHARMA, P., N. SINGH, R. GARG, W. HAQ, AND A. DUBE. 2004. Efficacy of human beta-casein fragment (54-59) and its synthetic analogue compound 89/215 against *Leishmania donovani* in hamsters. *Peptides* 25:1873-1881.
- SILVA, F., R. GOMES, D. PRATES, J. C. MIRANDA, B. ANDRADE, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72:94-98.
- SILVA-JARDIM, I., M. F. HORTA, AND F. J. RAMALHO-PINTO. 2004. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop* 91:121-130.
- SINGH, N., P. K. MISHRA, A. KAPIL, K. R. ARYA, R. MAURYA, AND A. DUBE. 2005. Efficacy of *Desmodium gangeticum* extract and its fractions against experimental visceral leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 98:83-88.
- SINGH, V. K., S. BALARAMAN, P. TEWARY, AND R. MADHUBALA. 2004. *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1086-1095.

- SMELT, S. C., S. E. COTTERELL, C. R. ENGWERDA, AND P. M. KAYE. 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 164:3681-3688.
- SOARES, M. B., J. R. DAVID, AND R. G. TITUS. 1997. An in vitro model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. *Infect Immun* 65:2837-2845.
- SOARES, M. B., R. G. TITUS, C. B. SHOEMAKER, J. R. DAVID, AND M. BOZZA. 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160:1811-1816.
- SOARES, R. P., AND S. J. TURCO. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc* 75:301-330.
- SOMANNA, A., V. MUNDODI, AND L. GEDAMU. 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 277:25305-25312.
- SQUIRES, K. E., R. D. SCHREIBER, M. J. MCEL RATH, B. Y. RUBIN, S. L. ANDERSON, AND H. W. MURRAY. 1989. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol* 143:4244-4249.
- STAGER, S., D. F. SMITH, AND P. M. KAYE. 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165:7064-7071.
- STANLEY, A. C., AND C. R. ENGWERDA. 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 85:138-147.
- STARK, K. R., AND A. A. JAMES. 1996. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 33:645-650.
- STEBECK, C. E., G. S. BARON, R. P. BEECROFT, AND T. W. PEARSON. 1996. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 from African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 81:81-88.
- STEBECK, C. E., R. P. BEECROFT, B. N. SINGH, A. JARDIM, R. W. OLAFSON, C. TUCKEY, K. D. PRENEVOST, AND T. W. PEARSON. 1995. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* 71:1-13.
- STEMPIN, C., L. GIORDANENGO, S. GEA, AND F. CERBAN. 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol* 72:727-734.

STOUT, R. D., AND J. SUTTLES. 2005. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* 205:60-71.

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

SVENSJO, E., P. R. BATISTA, C. I. BRODSKYN, R. SILVA, A. P. LIMA, V. SCHMITZ, E. SARAIVA, J. B. PESQUERO, M. A. MORI, W. MULLER-ESTERL, AND J. SCHARFSTEIN. 2006. Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 8:206-220.

TARACHA, E. L., R. BISHOP, A. J. MUSOKE, A. V. HILL, AND S. C. GILBERT. 2003. Heterologous priming-boosting immunization of cattle with Mycobacterium tuberculosis 85A induces antigen-specific T-cell responses. *Infect Immun* 71:6906-6914.

TEIXEIRA, C. R., M. J. TEIXEIRA, R. B. GOMES, C. S. SANTOS, B. B. ANDRADE, I. RAFFAELE-NETTO, J. S. SILVA, A. GUGLIELMOTTI, J. C. MIRANDA, A. BARRAL, C. BRODSKYN, AND M. BARRAL-NETTO. 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175:8346-8353.

TEIXEIRA, M. J., C. R. TEIXEIRA, B. B. ANDRADE, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22:32-40.

TEIXEIRA, M. J., J. D. FERNANDES, C. R. TEIXEIRA, B. B. ANDRADE, M. L. POMPEU, J. SANTANA DA SILVA, C. I. BRODSKYN, M. BARRAL-NETTO, AND A. BARRAL. 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73:1191-1195.

THEODOS, C. M., AND R. G. TITUS. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol* 15:481-487.

THEODOS, C. M., J. M. RIBEIRO, AND R. G. TITUS. 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 59:1592-1598.

THIAKAKI, M., I. ROHOUSOVA, V. VOLFOVA, P. VOLF, K. P. CHANG, AND K. SOTERIADOU. 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect* 7:760-766.

THOMAS, M. C., J. L. GARCIA-PEREZ, C. ALONSO, AND M. C. LOPEZ. 2000. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol* 19:47-57.

TITUS, R. G. 1998. Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells in vivo and concanavalin A in vitro. *Exp Parasitol* 89:133-136.

TITUS, R. G., AND J. M. RIBEIRO. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306-1308.

TITUS, R. G., AND J. M. RIBEIRO. 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today* 6:157-160.

TITUS, R. G., C. M. THEODOS, P. B. KIMSEY, A. SHANKAR, L. HALL, M. MCGURN, AND L. POVINELLI. 1992. Role of T cells in immunity to the intracellular pathogen. *Leishmania major*. *Subcell Biochem* 18:99-129.

TITUS, R. G., J. V. BISHOP, AND J. S. MEJIA. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 28:131-141.

TOLSON, D. L., A. IARDIM, L. F. SCHNUR, C. STEBECK, C. TUCKEY, R. P. BEECROFT, H. S. TEH, R. W. OLAFSON, AND T. W. PEARSON. 1994. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 62:4893-4899.

TONUI, W. K., AND R. G. TITUS. 2007. Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg* 76:579-584.

TROMBETTA, E. S., AND I. MELLMAN. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23:975-1028.

TRUJILLO, C., R. RAMIREZ, I. D. VELEZ, AND C. BERBERICH. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70:203-209.

TSANG, C., S. BABIUK, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, L. A. BABIUK, AND P. GRIEBEL. 2007. A single DNA immunization in combination with electroporation prolongs the primary immune response and maintains immune memory for six months. *Vaccine* 25:5485-5494.

TUPIN, E., Y. KINJO, AND M. KRONENBERG. 2007. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5:405-417.

TZELEPIS, F., ALENCAR, B.C.G., PENIDO, M.L.O., CLASER, C., MACHADO, A.V., BRUNA-ROMERO, O., GAZZINELLI, R., RODRIGUES, M. 2008. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J. Immunol.* 180:1737-1748.

VALENZUELA, J. G., M. GARFIELD, E. D. ROWTON, AND V. M. PHAM. 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the

- sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol* 207:3717-3729.
- VALENZUELA, J. G., Y. BELKAID, E. ROWTON, AND J. M. RIBEIRO. 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol* 204:229-237.
- VALENZUELA, J. G., Y. BELKAID, M. K. GARFIELD, S. MENDEZ, S. KAMHAWI, E. D. ROWTON, D. L. SACKS, AND J. M. RIBEIRO. 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194:331-342.
- VAN DER POUW KRAAN, T. C., L. C. BOEIJE, R. J. SMEENK, J. WIJDENES, AND L. A. AARDEN. 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 181:775-779.
- VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., C. WIESMANN, AND E. J. BROWN. 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9:2095-2102.
- VERAS, P., C. BRODSKYN, F. BALESTIERI, L. FREITAS, A. RAMOS, A. QUEIROZ, A. BARRAL, S. BEVERLEY, AND M. BARRAL-NETTO. 1999. A dhfr-ts- *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:491-496.
- VILELA MDE, C., D. C. GOMES, A. MARQUES-DA-SILVA EDE, T. D. SERAFIM, L. C. AFONSO, AND S. A. REZENDE. 2007. Successful vaccination against *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice with freeze-thawed *Leishmania* antigen and *Corynebacterium parvum*. *Acta Trop* 104:133-139.
- VON STEBUT, E. 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 17:115-122.
- VON STEBUT, E., J. M. EHRCHEN, Y. BELKAID, S. L. KOSTKA, K. MOLLE, J. KNOP, C. SUNDERKOTTER, AND M. C. UDEY. 2003. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* 198:191-199.
- VON STEBUT, E., Y. BELKAID, B. NGUYEN, M. WILSON, D. L. SACKS, AND M. C. UDEY. 2002. Skin-derived macrophages from *Leishmania major*-susceptible mice exhibit interleukin-12- and interferon-gamma-independent nitric oxide production and parasite killing after treatment with immunostimulatory DNA. *J Invest Dermatol* 119:621-628.
- VON STEBUT, E., Y. BELKAID, T. JAKOB, D. L. SACKS, AND M. C. UDEY. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 188:1547-1552.

- WAHBA, M., AND C. RIERA. 2006. Salivary gland composition of some Old World vector sand fly. *J Egypt Soc Parasitol* 36:289-296.
- WAITUMBI, J., AND A. WARBURG. 1998. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infect Immun* 66:1534-1537.
- WALKER, W., AND D. ROTONDO. 2004. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology* 111:298-305.
- WILSON, M. E., D. J. INNES, A. D. SOUSA, AND R. D. PEARSON. 1987. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol* 73:55-63.
- WILSON, M. E., M. SANDOR, A. M. BLUM, B. M. YOUNG, A. METWALI, D. ELLIOTT, R. G. LYNCH, AND J. V. WEINSTOCK. 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* 156:2231-2239.
- WILSON, M. E., S. M. JERONIMO, AND R. D. PEARSON. 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 38:147-160.
- WOLFF, J. A., R. W. MALONE, P. WILLIAMS, W. CHONG, G. ACSADI, A. JANI, AND P. L. FELGNER. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.
- WU, C. Y., K. WANG, J. F. MCDYER, AND R. A. SEDER. 1998. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 161:2723-2730.
- YARALI, N., T. FISGIN, F. DURU, AND A. KARA. 2002. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. *Am J Hematol* 71:191-195.
- YOSHIKAWA T, IMAZU S, GAO JQ, HAYASHI K, TSUDA Y, OKADA N, TSUTSUMI Y, AKASHI M, MAYUMI T, NAKAGAWA S. 2006. Non-methylated CpG motif packaged into fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice. *Biol Pharm Bull*. Jan;29(1):105-9.
- ZADEH-VAKILI, A., T. TAHERI, Y. TASLIMI, F. DOUSTDARI, A. H. SALMANIAN, AND S. RAFATI. 2004. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. *Vaccine* 22:1930-1940.
- ZANIN, F. H., E. A. COELHO, C. A. TAVARES, E. A. MARQUES-DA-SILVA, M. M. SILVA COSTA, S. A. REZENDE, R. T. GAZZINELLI, AND A. P. FERNANDES. 2007. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9:1070-1077.

ZER, R., I. YAROSLAVSKI, I. ROSEN, AND A. WARBURG. 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 31:810-814.

ZIMMERMANN, S., A. DALPKE, AND K. HEEG. 2007. CpG oligonucleotides as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. *Int J Med Microbiol*.

ANEXO

Immunity to KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis development

Robson Silva^{* §}, **Natália Machado**^{*}, **Dirceu Costa**^{*}, **Maiana Pitombo**^{*}, **Larrissa Barbosa**^{*}, **Kyioshi Fukutani**^{*}, **Camila I. de Oliveira**^{*}, **Jose C. Miranda**^{*}, **Manoel Soto**, **Aldina Barral**^{*}, **Manoel Barral-Netto**^{*}, **Jesus G. Valenzuela**^{†☼}, and **Cláudia I. Brodskyn**^{†☼}

^{*}Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil;

[§] Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil; [†]Instituto de Investigação em Imunologia, Salvador, Bahia, Brazil; [‡]Vector Molecular Biology Unit, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 12735 Twinbrook Parkway, Rockville, MD, 20852-8132, USA

☼ To whom correspondence should be addressed:

Dr. Cláudia I. Brodskyn, Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão, 121, Salvador, Bahia, Brazil.

40295-001. Phone: 55-71-3176 2211, Fax: 55-71-3176 2279, E-mail address:

brodskyn@cpqgm.fiocruz.br.

Jesus G. Valenzuela, Vector Molecular Biology Unit, Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID, National Institutes of Health. 12735 Twinbrook Parkway, Room 2E-22C, Rockville, Maryland, 20852, USA. Phone: 301-402-1582, Fax: 301-594-5373, E-mail address: jvalenzuela@niaid.nih.gov.

Manuscript information: 32 pages including references and figure legends, six figures and one table.

Abbreviations: DTH, delayed-type hypersensitivity; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SGH, salivary gland homogenate; VL, visceral leishmaniasis; i.d., intradermal.

Abstract

Hamsters are able to reproduce many clinical features observed in human visceral leishmaniasis. This model has been largely used aiming to understand the immune responses against *Leishmania donovani* complex species. Recent reports have shown that hamster immunization with plasmids encoding for *L. longipalpis* salivary gland proteins (LJM19) and plasmids encoding for *Leishmania* parasitic antigens (KMP11) can protect these animals against a mortal challenge with *Leishmania*. In this study, hamsters were used to evaluate the existence of additional protection by immunization with these two plasmids administrated together. Plasmids induced IFN- γ production in draining lymph nodes of immunization site 7, 14 and 21 days after the last immunization. Evaluation of immunized and challenged hamsters with *L. chagasi* plus SGS from vector 7 and 14 days after the challenge showed an enhancement of IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β in draining lymph nodes. Two and five months after challenge, immunized animals showed lower parasite loads in liver and spleen and higher IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β relations in the spleen two months after challenge. Moreover, immunized hamsters showed higher liver and spleen morphological conservation and did not develop hematological disturbances five months after the challenge when compared with healthy control animals. Additional protection was not observed in immunization with plasmids administrated together.

Key words: Hamster, *Leishmania chagasi*, visceral leishmaniasis, saliva, DNA plasmids, protection.

Introduction

Parasitic protozoa of the genus *Leishmania* are transmitted by sand flies, and are the etiological agents of cutaneous, mucocutaneous or visceral diseases in humans. Saliva from sand flies and other blood feeders contains potent pharmacologic components that facilitate blood meals and evading host inflammatory and immune response (Ribeiro *et al.*, 2004; Bezerril *et al.*, 2005). Arthropod vector saliva also plays a role in pathogen transmission. A small amount of vector saliva can exacerbate parasite or virus infectivity (Titus *et al.*, 1988; Theodos *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 1996; Belkaid *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998; Zer *et al.*, 2001). On the other hand, the immune response to arthropod saliva or bites precludes establishment of the pathogen in the vertebrate host. Recent reports have shown the importance of salivary proteins from sand flies vectors as potential targets for vaccine development to control *Leishmania* infection (Kamhawi *et al.*, 2000; Valenzuela 2001).

Mice immunized with *Phlebotomus papatasi* salivary gland homogenate (SGH) or pre-exposed to uninfected sand fly bites, in animal models of cutaneous leishmaniasis (CL), were protected against *Leishmania major* infection delivered by needle inoculation (Belkaid *et al.*, 1998) or by infected sand flies (Kamhawi *et al.*, 2000). Furthermore, immunization with PpSP15 and maxadilan, salivary proteins from *P. papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*, respectively, also protected against *L. major* infection in mice (Valenzuela *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001).

L. infantum chagasi is the cause of VL in Latin America and the only proven natural vector is *Lu. longipalpis*. A recent study showed that immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model (Gomes *et al.*, 2008). The hamster model of visceral leishmaniasis

(VL) closely mimics features of active human disease. Following systemic infection with *L. donovani*, these animals develop a progressively increasing visceral parasite burden, massive splenomegaly, bone marrow dysfunction, cachexia, pancytopenia, hypergammaglobulinaemia, and ultimately death (Melby *et al.*, 2001). Hamster infection can be achieved by the injection of a large number of parasites via the intravenous, intracardial or intraperitoneal route (Palatnik-de-Souza *et al.*, 1994; Bories *et al.*, 1998; Melby *et al.*, 1998; Basu *et al.*, 2005). However, hamsters immunization with DNA plasmid encoding for LJM19, a *Lu. longipalpis* salivary protein, protected them from disease development (Gomes *et al.*, 2008).

In a recent study, the capacity of *L. donovani* kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 induce protective immunity in hamster was evaluated (Basu *et al.*, 2005). Immunization of hamsters with DNA plasmids encoding for KMP11 induced a mixed Th1/Th2 T cellular immune response, with high levels of IFN- γ , tumor necrosis factor- α , IL-4 and IL-12 but a lack of IL-10. The vaccinated hamsters were protected from the disease. The demonstration that human CD8⁺ T cells from infected patients recognize KMP-11 and that human macrophages can present KMP-11 epitopes associated to MHC class I pointed this protein as a potent candidate for anti-*Leishmania* vaccine development (Diez *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2007). The combination of protective antigens has been studied by different authors aiming enhance protection against *Leishmania* infection (Iborra *et al.*, 2004). In this study we evaluated the combination of DNA plasmids encoding for LJM19 or KMP-11 as inducers of protective immunity against *L. infantum chagasi* infection in the hamster model.

2. Methods

2.1. Sand flies and their salivary gland lysates

Laboratory colonies of *Lutzomyia longipalpis* were reared at the Gonçalo Moniz Research Center. Salivary gland from adult female flies were dissected and transferred to 10 or 20 µl HEPES 10 mM pH 7.0 NaCl 0.15 in 1.5 polypropylene vials, usually in groups of 20 pairs of gland in 20 µl of HEPES saline, or individually in 10 µl of HEPES saline. Salivary glands were kept at -75°C until needed, when they were disrupted by sonication using a Branson Sonifier 450 homogenizer (Branson, Danbury, CT) (Ribeiro *et al.*, 2001). Salivary homogenates were centrifuged at 10,000 g x 2 min; the supernatants were used in the experiments.

2.2. Leishmania parasites

L. infantum chagasi (MHOM/BR00/MER/ STRAIN2) promastigotes were cultivated in Schneider's insect Medium (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) supplemented, with 20% inactivated FCS, L-glutamine (2mM), penicillin (100U/ml), streptomycin (100 µg/ml) at 23 °C for 5-7 days when parasites reached the stationary-phase. The parasites used in hamsters infections were washed 3 times with saline at 3000 rpm for 10 min, resuspended in saline and adjusted to $5 \times 10^7 - 10^8$ per ml.

2.3. Construction of DNA plasmids coding for *Lu. longipalpis* salivary proteins and immunization of hamsters.

Male Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*) at 10-12 weeks-old, from Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, were used for experimental purposes with prior approval of the animal ethics committee of the Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Bahia-

Brazil. DNA plasmids coding for *Lu. longipalpis* salivary proteins were cloned into the VR2001-TOPO vector and purified as previously described [8]. KMP11 encoding plasmids were a kind gift from Dr. Manoel Sotto of Universidad Autónoma de Madrid, Spain (Fuertes et al, 2001). Groups of hamsters were immunized intradermally (i.d.) (Belkaid et al., 1998) in the left ear each with 10 µg/animal of LJM19 or 100 µg/animal of KMP11 plasmids for three times at 14 days interval. Control hamsters were immunized with saline or empty plasmids constructions VR2001-TOPO for LJM19 and pcDNA3 for KMP11. Each hamster received plasmids construction in 20 µl of saline in different situations: I- Only saline; II- LJM19 DNA, III- KMP11 DNA, IV- LJM19 and KMP11 DNA and V- Empty plasmids controls administrated together. Two weeks after the last immunization, hamsters were challenged i.d. in the right ear with 10^5 stationary phase promastigotes of *L. chagasi* plus equivalent of 0.5 salivary gland pairs in 20 µl of saline. Twenty-four and forty-eight hours after challenge delayed-type hypersensitivity reaction were measured by caliper. The diameter of right ear was subtracted from the left ear measurement in analyses.

2.4 IgG anti-saliva determination by ELISA

ELISA plates were coated with 5 pairs of salivary glands/ml (approximately 5 µg protein/ml) overnight at 4°C. After three washes with PBS-0.05% Tween, the plates were blocked for 1 hour at 37°C with PBS-0.05% Tween plus 3% BSA. Sera were diluted with 1:50 with PBS-0.05% Tween then incubated overnight at 4 °C. After further washes, the wells were incubated with alkaline-phosphatase-conjugated anti-hamster IgG (Jackson ImmunoResearch, west grove, PA, USA) at a 1:1000 dilution for 1 hour at 37°C. Following another washing cycle, the color was developed for 30 min

with a chromogenic solution of paranitrophenylphosphate 1 mg/ml and the reaction was stopped with NAOH 3M and analyzed at 405 nm.

2.5. Anti-*Leishmania* serology by ELISA

Leishmania were cultivated in Schneider's Medium, and parasites were disrupted by freeze-thaw cycles and then centrifuged at 40,000g for 20 min. Protein content of the supernatant was determined by method of Lowry. Samples were stored at -20°C until use. ELISA plates were coated with 10µg/ml with soluble antigen of *Leishmania* (SLA) overnight at 4°C. After three washes with PBS-0.05% Tween, the plates were blocked for 1 hour at 37°C with PBS-0.1% Tween plus 1% BSA. Sera were diluted with 1:100 with PBS-0.05% Tween then incubated overnight at 4 °C. After further washes, the wells were incubated with alkaline-phosphatase-conjugated anti-hamster IgG (Jackson ImmunoResearch, west grove, PA, USA) at a 1:1000 dilution for 1 hour at 37°C. Following another washing cycle, the color was developed for 30 min with a chromogenic solution of paranitrophenylphosphate 1 mg/ml and the reaction was stopped with NAOH 3M and analyzed at 405 nm.

2.6. Limiting Dilution Assay to determine parasites loads in infected tissues

Parasite load was determined using the quantitative limiting dilution assay as described by Lima *et al.* (1997). Briefly, infected ears, lymph nodes, liver and spleen were aseptically removed from each hamster at the completion of the experiments. Tissues were homogenized and diluted in Schneider's insect cell culture Medium (Sigma, St. Louis , MO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U of penicillin per ml and 100 µg/ml of streptomycin. Homogenate samples were each serially diluted in microtiter 96-wells in sixplets and incubated for one week at

23°C. Wells with positive growth were noted at specific dilutions as a measure of the parasites burdens in the tissues. Results were expressed as mean parasite titer \pm SD.

2.7. RNA isolation and quantitative Real-Time PCR of cytokine

Total RNA was extracted from the spleen and liver of infected hamsters using Trizol reagent (Invitrogen). First strand cDNA synthesis was performed with approximately 1-2 μ g of RNA in a total volume of 20 μ l using the SuperScript™ III reverse transcriptase. DNA was amplified adding 2 μ g of RNA in 30 μ l of a mix containing primers oligo (dT)12-18, 2,5 μ M, dNTPs, 1 mM (Invitrogen), buffer 1X (Tris-HCl 20mM, pH 8.4, KCl 50mM, MgCl₂ 2 mM.), 20U of ribonuclease inhibitor and 50U of Superscript II reverse transcriptase (Gibco). Amplification conditions consisted of an initial pre-incubation at 42°C for 50 min, followed by amplification of the target DNA for 40 cycles at 95°C for 5 min. A standard curve was generated for each set of primers and the efficiency of each reaction was determined. The expression levels of the genes were normalized to GAPDH levels. The results are expressed in fold change over control. Oligonucleotide primers used for real time PCR were: GAPDH (5'CTGACATGCCGCCCTGGAG; 3'TCAGTGTAGCCCAGGATGCC); IFN- γ (5'GAAGCTCACCAAGATTCCGGTAA; 3'TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT); IL-10 (5'AGACGCCTTTCTCTTGGAGCTTAT; 3'GGCAACTGCAGCGCTGTC); TGF- β (5'GCTACCACGCCAACTTCTGTC; 3'TGTTGGTAGAGGGCAAGG). Primers and probes for IL4, IL10, TGF- β , IFN- γ and GAPDH were obtained from Applied Biosystem, EUA. The real time reaction was performed in 96 well plates using SYBR-Green PCR Master Mix and Perkin-Elmer ABI Prism 7500 sequence detection system. Forty cycles reactions with 15 seconds at 94°C and 1 minute at 60° C were performed according with ABI-Prism 7500 manufacturer's instructions.

2.8. Hematological analyses

Blood samples were collected from animals groups for hematological evaluation two and five months after challenge. Blood smears were analyzed stained by Giemsa and cell counts were performed by a blood cell counter. Healthy hamsters were used as control for immunized and challenged animals.

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD. Comparisons among the experimental groups were done by one-way ANOVA (Kruskal-wallis) test with Dunn's post test using Graphpad software program. The level of significance was chosen when $p < 0.05$.

3. Results

3.1- Immunization with LJM19 and KMP11 enhances IFN- γ in draining lymph nodes and anti-*Leishmania* antibody production

Hamsters immunized with LJM19 and/or KMP11 codifying plasmids showed elevated IFN- γ production in draining lymph nodes. However, the production timing of these cytokines was particular to which DNA construction analyzed. The IFN- γ production was evaluated by real time PCR 7, 14, 21 days after the last immunization. Twenty-one days after last i.d. inoculation, KMP11 immunized hamsters showed a higher production of this pro-inflammatory cytokine ($p < 0.05$) when compared with control plasmids (Fig 1A). Once administrated together LJM19 and KMP11 plasmids constructions induced higher IFN- γ production on day 14 after challenge ($p < 0.05$). However, although LJM19 immunization enhances five times the IFN- γ production, no significant differences were observed when compared with control animal groups

($p > 0.05$). Hamsters immunized with LJM19 and KMP11 DNA plasmids showed higher anti-*Leishmania* antibody production 21 days after the challenge and presented an under curve area significantly higher than controls ($p < 0.05$) (Fig 1B). No differences in anti-saliva of *Lu. longipalpis* production were observed in all period times evaluated ($p > 0.05$) (data not shown).

3.2- Immunized hamsters show lower parasite load in the ear but not in the draining lymph nodes

The parasite load was evaluated 7 and 14 days in LJM19, KMP11 and KMP11 plus LJM19 immunized hamsters. Seven days after challenge with *L. chagasi* plus *Lu. longipalpis* saliva, LJM19 and/or KMP11 immunized hamsters showed lower parasite load in the ear. Interestingly, forty-eight hours after challenge KMP11 and LJM19 plus KMP11 immunized animals showed a significant DTH response in the ear when compared with control groups ($p < 0.05$) (Fig 2A). The reduction in parasites number in the ear was significantly lower in hamster immunized with LM19 plus KMP11 ($p < 0.05$) (Fig 2B). These animals showed a 100 and 1000 folder reduction in the parasite load seven and fourteen days after challenge, respectively. However, no differences were observed between immunized groups concerning parasite loads evaluated in the draining lymph nodes (dLN) at these time points pos-infection ($p < 0.05$) (Fig 2C). When IgG anti-saliva and anti-*Leishmania* were evaluated, no differences were observed among all groups of immunized hamsters seven and fourteen days after challenge (data not shown).

3.3. Immunization by LJM19 induce higher IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β production in draining lymph nodes of hamsters challenged with parasite plus saliva

To examine the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines profiles in immunized and challenged hamsters, real time PCR were performed in dLN samples at 7 and 14 days after challenge. LJM19 immunized hamsters showed a higher ratio between IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β production at these time points. These ratios were significantly higher than control animal groups ($p < 0.05$). KMP11 and LJM19 plus KMP11 immunized hamsters showed an enhancement of 3 and 2.5 times in the IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β productions, respectively. However, these ratios in the dLN did not show significant differences from the controls (Fig 3A and 3B).

3.4. Parasite load is decreased in spleen and liver of immunized hamsters

The observed enhancement in the IFN- γ production in dLN induced to analyses of the parasite load in the visceral sites in *L. chagasi* infection. Parasites loads in the liver and spleen were quantified two and five months after challenge. Two months after infection hamsters immunized with LJM19, KMP11 and LJM19 plus KMP11 showed a 10^5 folder reduction in the parasite load in the spleen compared with control group ($p < 0.05$) (Fig 4A). The liver of LJM19 and LJM19 plus KMP11 immunized hamsters did not show parasites when analyzed two months after challenge (Fig 4B). Parasite loads in the spleen and liver still remain lower five months after challenge in immunized hamsters with encoding DNA plasmids. Spleens and livers from LJM19 and LJM19 plus KMP11 immunized hamsters showed a 10^7 folder reduction at this time

point of evaluation and were significantly lower than saline and empty plasmids immunized hamsters ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Fig 4).

3.5. Immunized hamsters showed a lower IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β in the spleen five months after challenge with *L. chagasi* plus saliva

To understand the basis of the different outcomes of *L. chagasi* infection in hamsters immunized with plasmids encoding for LJM19, KMP11 or LJM19 plus KMP11 we compared the ratio between IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β of different groups of hamsters in the spleen, two and five months after challenge by real time PCR. We observed that two months after infection KMP11 immunized hamsters showed a higher IFN- γ /TGF- β but no differences in the IFN- γ /IL-10 were observed (Fig 5). However, five months after challenge all groups of immunized animals showed a reduced IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β relation in the spleen compared with control animal groups ($p < 0.05$) (Fig 5).

3.6. KMP11 plus LM19 immunized hamsters produce lower IgG anti-*Leishmania* antibodies

Immunization with KMP11 DNA was previously shown to induce a decreased anti-*Leishmania* antibodies production (Basu et al., 2005). In this report, we observed that hamsters immunized with KMP11 plus LJM19 DNA plasmids induced a lower production of these antibodies five months after challenge. This production was significantly lower than saline or empty control immunized animals and correlated to the lower parasite load observed at this time point of evaluation ($p < 0.05$) (Fig. 6A). However, no significant differences were observed between groups when anti-saliva IgG total antibodies were evaluated by ELISA (Fig 6B).

3.7. Hamsters immunized with DNA plasmids do not develop hematological disorders after challenge with *L. chagasi*

It is well known that patients with visceral leishmaniasis develop hematological disorders. Hamsters can reproduce many of these clinical features and develop anemia, leukopenia and pancytopenia. To examine if immunization with DNA plasmids could protect hamsters from anemia development, blood samples were evaluated two and five months after challenge. We observed that immunization of hamsters with DNA encoding plasmids abrogated the development of anemia. Healthy hamsters were used as control. Compared with healthy hamsters, our control animals showed a decreased number of red blood cells ($p < 0.05$), a decreased hematocrit ($p < 0.05$) and a reduced amount of hemoglobin ($p < 0.05$). However, immunized hamsters did not develop reduction of these hematimetric indices and did not show significant differences from the control animal groups ($p > 0.05$) (Table 1).

4. Discussion

Many authors have shown protection against different pathogens using immunization with DNA plasmids (Moreno et al., 2007; Hu et al., 2007; Zanin et al., 2007; Carter et al., 2007). In this study, we reaffirm that immunization with LJM19 codifying plasmids, a *L. longipalpis* salivar protein, can confer protection to hamsters challenged with *L. chagasi* plus *L. longipalpis* saliva in a hamster model. KMP11 immunized hamsters were protective in the same way, however the combination of plasmids do not induce higher protection in our model. DNA plasmids encoding for antigens are able to induce both T CD4⁺ and T CD8⁺ response (Ivory & Chadee, 2004; Garmory et al., 2005; Dumonteil, 2007). The expression of antigens in mammals cells and production of antibodies against these proteins after immunization have been shown

in different studies (Hirao et al., 2007; Coler et al., 2007). These responses usually are followed by a reduction of pro-inflammatory cytokines and an enhancement of pro-inflammatory cytokines production (Dondji et al., 2005). In the same way, immunization with DNA plasmids do not codifying for antigens, but holding immunostimulatory sequences, induce potent DTH response (Mazunder et al., 2007).

In this study we observed that only immunization with plasmids coding KMP11 or KMP11 plus LJM19 can induce anti-*Leishmania* antibodies production. KMP11 is a highly conserved trypanosomatid protein expressed in different stages of *Leishmania*, mainly in promastigotes (Jardim et al. 1991; Tolson et al., 1994; Jardim et al., 1995). This protein processed by macrophages are presented and recognized by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both human and murine models (Tolson et al., 1994; Basu et al., 2007). BALB/c mice immunized with KMP11 encoding plasmids showed IgG production and were protected against *Trypanosoma cruzi* challenge (Planelles et al., 2001).

Hamsters showed an enhancement in the dLN IFN- γ production when immunized with LJM19 and/or KMP11 DNA plasmids. However, a different timing in this cytokine production was observed in each immunization profile. This timing could be an important mechanism underlining immune response against pathogens after challenge. The presence of pro-inflammatory cytokines in early moments post-infection induce NK, lymphocytes and presenting cells activation enhancing IL-12 production and expression of co-stimulatory molecules (Gordon, 2002; Aliberti et al., 2003; Harizi & Galdi, 2005; Rodrigues et al., 2006; Cooper & Khader, 2006; Newman & Riley, 2007; Tupin & Kronenberg, 2007). This inflammatory environment with a higher

reactive oxygen derivatives production enables immune system cells to kill intracellular pathogens (Evans et al., 1993; Murray & Nathan, 1999; Murray et al., 2006).

Hamsters immunized with LJM19 and challenged with parasites plus saliva showed elevated IFN- γ /IL-10 e IFN- γ /TGF- β relations in dLN. Many studies show the important role of IL-10 as an anti-inflammatory cytokine, deactivating macrophages, diminishing NO production and facilitating *Leishmania* survival inside phagocytes (Ghalib et al., 1993; Oliver et al., 2005). In the same way, TGF- β is an important cytokine for parasite survival and disease progression (Gantt et al., 2003). Interestingly, our control hamsters showed higher ratios between IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β in the spleen five months after challenge. These ratios are in agreement with results studying human VL patients which show elevated parasite load even in a pro-inflammatory environment (Nylén et al, 2007).

The role of phlebotomine sand fly saliva have been shown both in animal and human models (Barral et al., 2000, Guilpin et al., 2002, Costa et al., 2004). Belkaid et al, 1998, showed that the pre-sensibilization with salivary compounds of *Phlebotomus papatasi* induced protection against a challenge with *L. major* plus saliva. Many studies have been shown similar results with different species of *Leishmania* and phlebotomines (Thiakaki et al., 2005; Morris et al., 2001). The formal demonstration that mice immunized with DNA plasmids codifying for SP15, a *P. papatasi* salivary component, and hamsters immunized with DNA plasmids encoding for LJM19, a *Lu. longipalpis* salivary protein, protect these animal models against *L. major* and *L. infantum chagasi* infection, respectively, point out for new topics in vaccination against *Leishmania* infection (Valenzuela et al., 2001; Gomes et al., 2008). These studies showed that DTH development at the site bites promote protective immunity against *Leishmania*.

Inflammatory cells could have contributed for lower parasites load observed in the ears 7 and 14 days after challenge in our study. However, even with the elevated IFN- γ /IL-10 and IFN- γ /TGF- β ratios in dLN, no reduction in parasite load was observed in this site. Interestingly, KMP11 immunized hamsters showed an enhancement in IFN- γ only 21 days after the last immunization. Then, this timing could be observed after challenge with *L. infantum chagasi* plus SGS. Hamsters immunized with LJM19 and/or KMP-11 codifying plasmids showed a significant reduction in the parasite load in the liver and spleen 2 and 5 months after challenge. Recently, was demonstrated that immunization with DNA encoding for KMP11 protected hamsters against *L. donovani* infection (Basu et al., 2005). In this study it was demonstrated that immunized hamsters with KMP11 DNA showed higher survival and lower parasites loads in the liver and spleen 2 and 4 months after challenge. This protection was correlated with an enhancement of inducible oxid nitric synthetase, IFN- γ and IL-4 production, a reduction of IL-10 and anti-*Leishmania* antibodies production (Basu et al., 2005).

Different studies have shown KMP11 conservation (Fuentes et al., 1999; Ramírez et al., 2002; Berberich et al., 2003; Delgado et al., 2003; Carvalho et al., 2005; Diez et al., 2006). Both patients with Chagas disease and leishmaniasis recognize KMP11 by antibodies (Thomas et al., 2001). Human TCD8+ T cells can be activated by *L. donovani* infected macrophages presenting KMP11 epitopes by HLA class I (Basu et al., 2007). The activation of cytotoxic cells demonstrated that *L. donovani* infected mice treated with KMP11 transfected macrophages showed a reduction in the spleen and liver parasite loads (Basu et al., 2007). This reduction was associated to strong T CD8+ cells activation and IL-10 inhibition, but not IL-4 and IL-13 (Basu et al., 2007).

Interestingly, in our study the combination of DNA plasmids encoding for KMP-11 and LJM19 did not enhance the protection observed in immunized hamsters.

Probably, this could be the up most protection using this immunization profile. Different immunization protocols must be used to reach higher protection. Prime/booster immunization has been shown excellent results in leishmaniasis vaccines development protocols (Dondji et al., 2005; Ramos et al., 2008). In the same way, *Leishmania* antigens entrapment in liposomes and nanoparticles have shown good results (Sharma et al., 2006; Greenland & Letvin, 2007).

In summary, we have demonstrated the ability of KMP11 DNA plasmid induce a protective immune response against *L. infantum chagasi* infection in the hamster model. We reaffirm the earlier observed protection against this *Leishmania* specie in hamsters immunized with LJM19 DNA plasmids. This protection is followed by an enhancement of IFN- γ production in the dLN and a reduction in parasites loads in liver and spleen. However, the combination of DNA plasmids encoding for KMP-11 or LJM19 does not enhance these protective effects.

Acknowledgments

We thank Sheila Dreher for construction of DNA plasmids, Edivaldo Passos for technical assistance and Nancy Shulman for editorial assistance. This research was supported in part by The Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, The National Institutes of Health and by FAPESB, CNPq and CAPES. CB, CIO are senior investigators of CNPq-Brasil. RAAS received a fellowship from CNPq during his Ph.D. studies.

References

- Aliberti, J., J. P. Viola, A. Vieira-de-Abreu, P. T. Bozza, A. Sher, and J. Scharfstein. 2003. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* 170:5349-5353.
- Andrade, B. B., C. I. de Oliveira, C. I. Brodskyn, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2007. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66:122-127.
- Barral, A., E. Honda, A. Caldas, J. Costa, V. Vinhas, E. D. Rowton, J. G. Valenzuela, R. Charlab, M. Barral-Netto, and J. M. Ribeiro. 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62:740-745.
- Basu, R., S. Bhaumik, A. K. Haldar, K. Naskar, T. De, S. K. Dana, P. Walden, and S. Roy. 2007. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting strong CD8+CTL response with concomitant suppression of IL-10 but not IL-4 and IL-13. *Infect Immun*.
- Basu, R., S. Bhaumik, J. M. Basu, K. Naskar, T. De, and S. Roy. 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174:7160-7171.
- Basu, R., S. Roy, and P. Walden. 2007. HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *J Infect Dis* 195:1373-1380.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, 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. *J Exp Med* 188: 1941-1953.
- Berberich, C., J. R. Ramirez-Pineda, C. Hambrecht, G. Alber, Y. A. Skeiky, and H. Moll. 2003. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170:3171-3179.
- Berberich, C., J. R. Ramirez-Pineda, C. Hambrecht, G. Alber, Y. A. Skeiky, and H. Moll. 2003. Bories C, Coffin C, Mathieu D, Bories PN, Scherman E, et al. (1998) Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 685-692.
- Carter, K. C., F. L. Henriquez, S. A. Campbell, C. W. Roberts, A. Nok, A. B. Mullen, and E. McFarlane. 2007. DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection. *Vaccine* 25:4502-4509.
- Carvalho, L. P., S. Passos, W. O. Dutra, M. Soto, C. Alonso, K. J. Gollob, E. M. Carvalho, and A. Ribeiro de Jesus. 2005. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61:337-342.

Coler, R. N., Y. Goto, L. Bogatzki, V. Raman, and S. G. Reed. 2007. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75:4648-4654.

Cooper, A. M., and S. A. Khader. 2007. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 28:33-38.

Costa, D. J., C. Favali, J. Clarencio, L. Afonso, V. Conceicao, J. C. Miranda, R. G. Titus, J. Valenzuela, M. Barral-Netto, A. Barral, and C. I. Brodskyn. 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72:1298-1305.

Delgado, G., C. A. Parra-Lopez, L. E. Vargas, R. Hoya, M. Estupinan, F. Guzman, A. Torres, C. Alonso, I. D. Velez, C. Spinel, and M. E. Patarroyo. 2003. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* 25:199-209.

Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170:3171-3179.

Diez, H., M. C. Lopez, M. Del Carmen Thomas, F. Guzman, F. Rosas, V. Velazco, J. M. Gonzalez, and C. Puerta. 2006. Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 28:101-105.

Dondji, B., E. Perez-Jimenez, K. Goldsmith-Pestana, M. Esteban, and D. McMahon-Pratt. 2005. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73:5286-5289.

Dumonteil, E. 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol* 2007:90520.

Evans, T. G., L. Thai, D. L. Granger, and J. B. Hibbs, Jr. 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151:907-915.

Fuertes, M. A., C. Berberich, R. M. Lozano, G. Gimenez-Gallego, and C. Alonso. 1999. Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 260:559-567.

Gantt, K. R., S. Schultz-Cherry, N. Rodriguez, S. M. Jeronimo, E. T. Nascimento, T. L. Goldman, T. J. Recker, M. A. Miller, and M. E. Wilson. 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 170:2613-2620.

Garmory, H. S., S. D. Perkins, R. J. Phillipotts, and R. W. Titball. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1343-1361.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.

Greenland JR, Letvin NL. 2007. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*. May 10;25(19):3731-41. Epub 2007 Feb 20.

Guilpin, V. O., C. Swardson-Olver, L. Nosbisch, and R. G. Titus. 2002. Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437-446.

Harizi, H., and N. Gualde. 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 65:507-514.

Harizi, H., and N. Gualde. 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 65:507-514.

Hirao, L. A., L. Wu, A. S. Khan, A. Satishchandran, R. Draghia-Akli, and D. B. Weiner. 2008. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 26:440-448.

Hu, H., X. Lu, L. Tao, B. Bai, Z. Zhang, Y. Chen, F. Zheng, J. Chen, Z. Chen, and H. Wang. 2007. Induction of specific immune responses by severe acute respiratory syndrome coronavirus spike DNA vaccine with or without interleukin-2 immunization using different vaccination routes in mice. *Clin Vaccine Immunol* 14:894-901.

Iborra, S., J. Carrion, C. Anderson, C. Alonso, D. Sacks, and M. Soto. 2005. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun* 73:5842-5852.

Ivory, C., and K. Chadee. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther* 2:17.

Jardim, A., S. Hanson, B. Ullman, W. D. McCubbin, C. M. Kay, and R. W. Olafson. 1995. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J* 305 (Pt 1):315-320.

Jardim, A., V. Funk, R. M. Caprioli, and R. W. Olafson. 1995. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305 (Pt 1):307-313.

Kamhawi, S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2:1765-1773.

Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG (1997) A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today* 13: 80-82.

Lima, H. C., and R. G. Titus. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64:5442-5445.

Mazumder, S., R. Ravindran, A. Banerjee, and N. Ali. 2007. Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine* 25:8771-8781.

Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W (1998) Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 66: 18-27.

Melby, P. C., B. Chandrasekar, W. Zhao, and J. E. Coe. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166:1912-1920.

Moreno, J., J. Nieto, S. Masina, C. Canavate, I. Cruz, C. Chicharro, E. Carrillo, S. Napp, C. Reymond, P. M. Kaye, D. F. Smith, N. Fasel, and J. Alvar. 2007. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25:5290-5300.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167: 5226-5230.

Murray, H. W., and C. F. Nathan. 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189:741-746.

Murray, H. W., Z. Xiang, and X. Ma. 2006. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Am J Trop Med Hyg* 74:1013-1015.

Newman, K. C., and E. M. Riley. 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7:279-291.

Nylen, S., R. Maurya, L. Eidsmo, K. D. Manandhar, S. Sundar, and D. Sacks. 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 204:805-817.

Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, et al. (2006) From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24: 374-390.

Olivier, M., D. J. Gregory, and G. Forget. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18:293-305.

Palatnik-de-Sousa CB, Paraguai-de-Souza E, Gomes EM, Borojevic R (1994) Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). *Braz J Med Biol Res* 27: 547-551.

Planelles, L., M. C. Thomas, C. Alonso, and M. C. Lopez. 2001. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun* 69:6558-6563.

Ramos, I., A. Alonso, J. M. Marcen, A. Peris, J. A. Castillo, M. Colmenares, and V. Larraga. 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26:333-344.

Ribeiro, J. M., R. Charlab, and J. G. Valenzuela. 2001. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 204:2001-2010.

Sharma, P., N. Singh, R. Garg, W. Haq, and A. Dube. 2004. Efficacy of human beta-casein fragment (54-59) and its synthetic analogue compound 89/215 against *Leishmania donovani* in hamsters. *Peptides* 25:1873-1881.

Theodos, C. M., J. M. Ribeiro, and R. G. Titus. 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 59:1592-1598.

Thiakaki, M., I. Rohousova, V. Volfova, P. Volf, K. P. Chang, and K. Soteriadou. 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect* 7:760-766.

Thomas, M. C., J. L. Garcia-Perez, C. Alonso, and M. C. Lopez. 2000. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol* 19:47-57.

Titus, R. G., and J. M. Ribeiro. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306-1308.

Tolson, D. L., A. Jardim, L. F. Schnur, C. Stebeck, C. Tuckey, R. P. Beecroft, H. S. Teh, R. W. Olafson, and T. W. Pearson. 1994. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 62:4893-4899.

Tupin, E., Y. Kinjo, and M. Kronenberg. 2007. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5:405-417.

Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, M. K. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E. D. Rowton, D. L. Sacks, and J. M. Ribeiro. 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194:331-342.

Zanin, F. H., E. A. Coelho, C. A. Tavares, E. A. Marques-da-Silva, M. M. Silva Costa, S. A. Rezende, R. T. Gazzinelli, and A. P. Fernandes. 2007. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9:1070-1077.

Figures legends

Figura 1. (A) Interferon- γ production in DNA plasmids codifying KMP11 and LJM19 immunized hamsters. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Retromandibulares dLD were collected 7, 14 and 21 days after last immunization and the IFN- γ production was evaluated by real time PCR. The relative quantification (RQ) was obtained using no immunized control hamsters (B) Anti-*Leishmania* antibodies production. Antibodies production was evaluated by ELISA 7, 14 and 21 days after last immunization. (C). Under curve area in anti-*Leishmania* antibodies production. n=6. *p<0.05.

Figure 2. Ear and dLN parasites loads in early moments pos ection by *L. infantum chagasi*. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Two weeks after the last immunization hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Twenty-four and forty-eight hours after challenge ears thickness were evaluated by a caliper and subtracted from the lateral ear. Ears and Retromandibulares dLD were collected 7 and 14 days after challenge. Parasites loads of the ears and dLN were evaluated by limiting dilution assay (ELIDA). (A) DTH response in challenged hamsters. (B) Ear parasite load. (C) dLN parasite load. n=6. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 3. Cytokines expression by dLN DNA plasmids codifying KMP11 and LJM19 immunized and challenged hamsters. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Two weeks after the last immunization

hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Retromandibulares dLD were collected 7 and 14 days after challenge. IFN- γ , IL-10 and TGF- β production was evaluated by real time PCR. The relative quantification (RQ) was obtained using no immunized control hamsters. (A) IFN- γ /IL-10. (B) IFN- γ /TGF- β n=6. *p<0.05.

Figure 4. DNA plasmids codifying KMP11 and LJM19 immunized and challenged hamsters spleen and liver parasites loads. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and control plasmids. Two weeks after the last immunization hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Two and five months after challenge spleen and liver were collected and weighted. Parasites loads of the ears and dLN were evaluated by limiting dilution assay (ELIDA). (A). Spleen parasite load. (B). Liver parasite load. n=8. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 5. Spleen cytokine expression in immunized hamsters challenged with *L. infantum chagasi* plus saliva. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Two weeks after the last immunization hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Two and five months after challenge spleen samples were collected. IFN- γ , IL-10 and TGF- β production was evaluated by real time PCR. The relative quantification (RQ) was obtained using no immunized control hamsters. (A) IFN- γ /IL-10. (B) IFN- γ /TGF- β . n=8. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 6. Antibodies production in DNA plasmids codifying KMP11 and LJM19 immunized hamsters challenged with *L. infantum chagasi*. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Two weeks after the last immunization hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Two and five months after challenge blood samples were collected. Anti-*Leishmania* and anti-saliva antibodies production were evaluated by ELISA. (A). Anti-*Leishmania* antibodies production. (B). Anti-saliva antibodies production. n=8. * p<0.05.

Table 1. Eritrogram from DNA plasmids codifying KMP11 and LJM19 immunized hamsters challenged with *L. infantum chagasi*. Hamsters were immunized for three times in the ear dermis. Groups of animals were immunized with saline, LJM19, KMP11, KMP11 plus LJM19 and empty control plasmids. Two weeks after the last immunization hamsters were challenged with 10^5 *L. infantum chagasi* plus 0.5 salivary gland par equivalent in the lateral ear. Two and five months after challenge blood samples were collected and evaluated by a blood cell counter. Blood smears were confectioned for morphological analysis by light microscopy. n=6. * p<0.05.

Figure 1

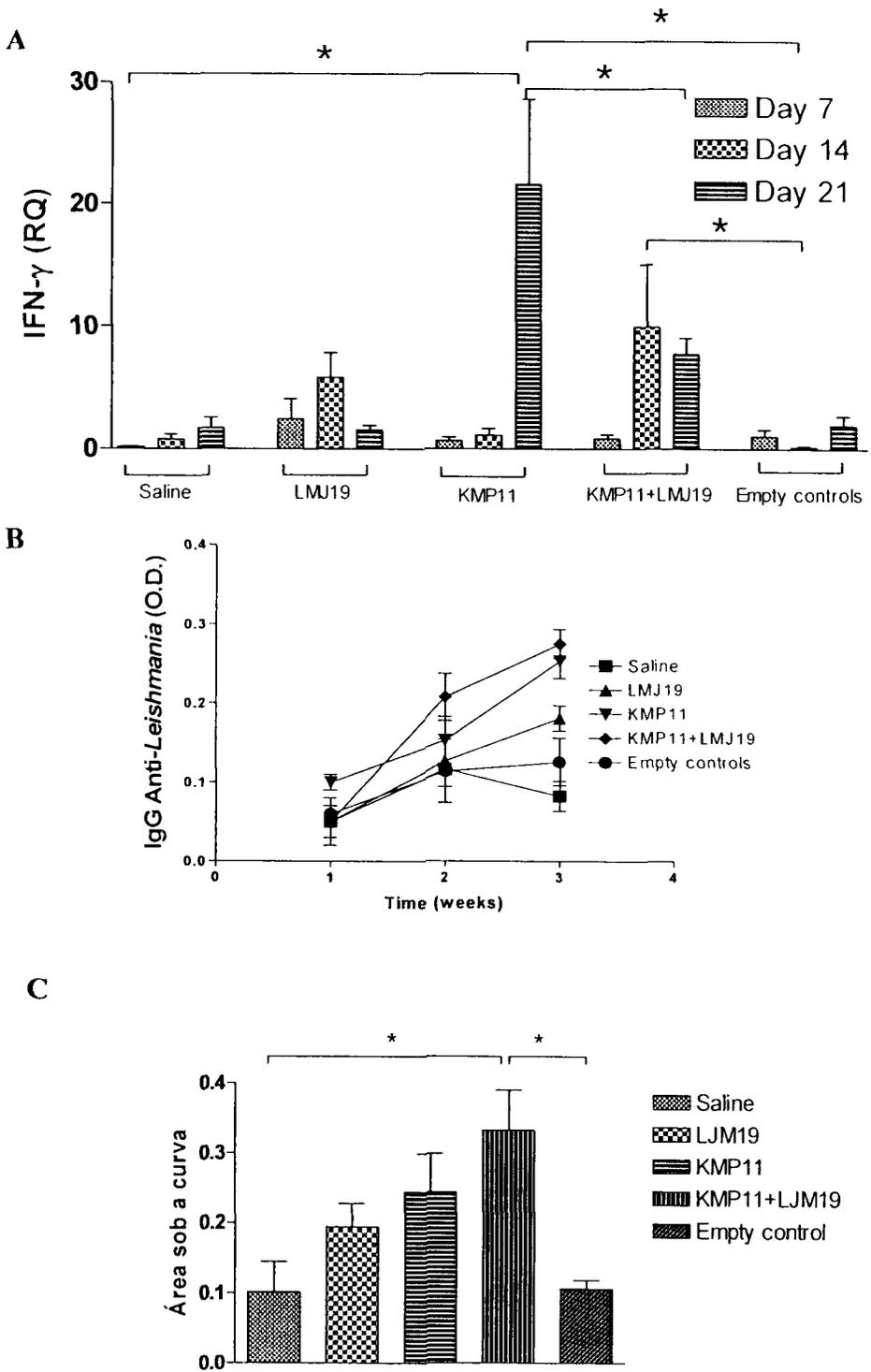


Figure 2

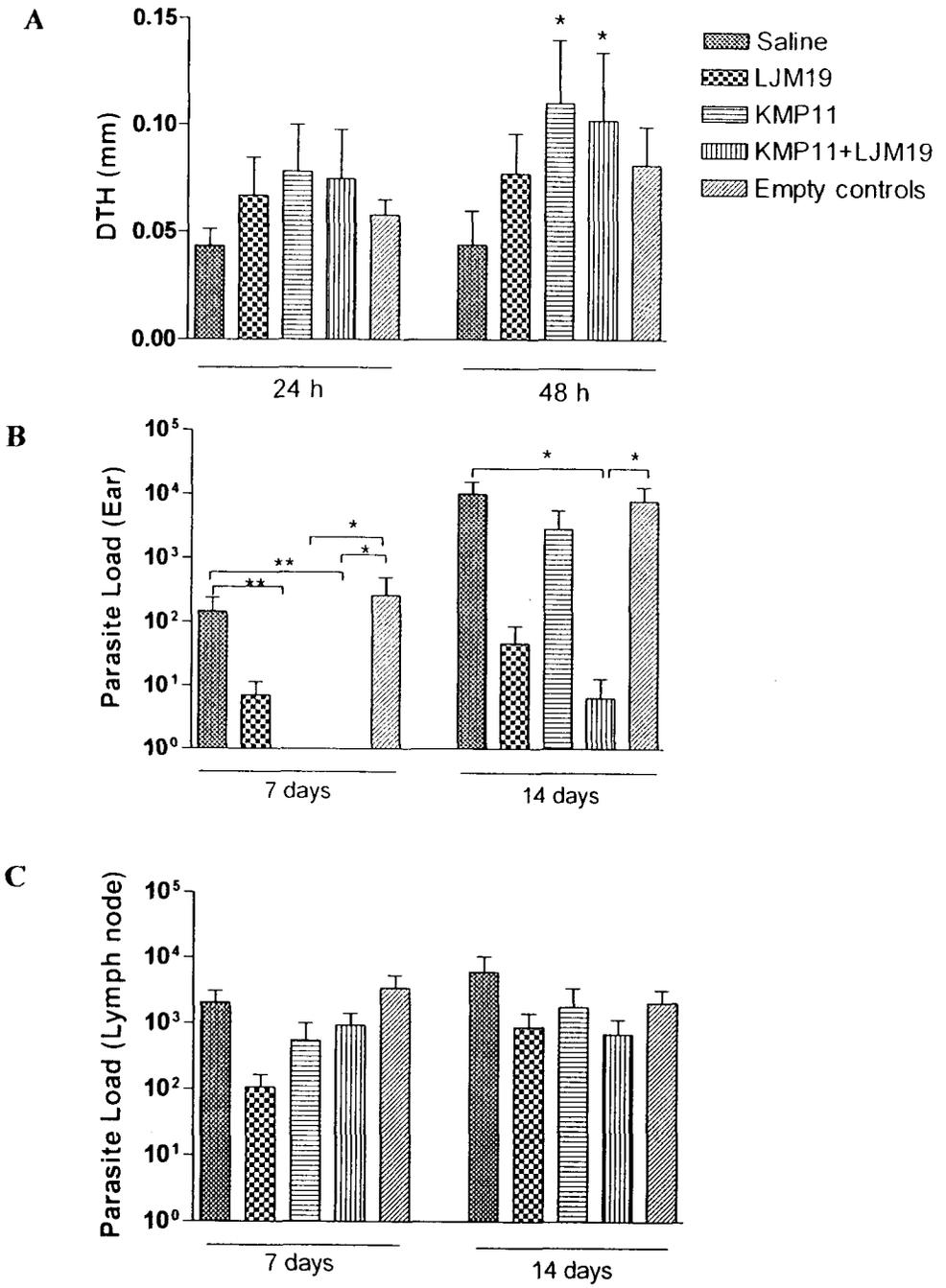


Figure 3

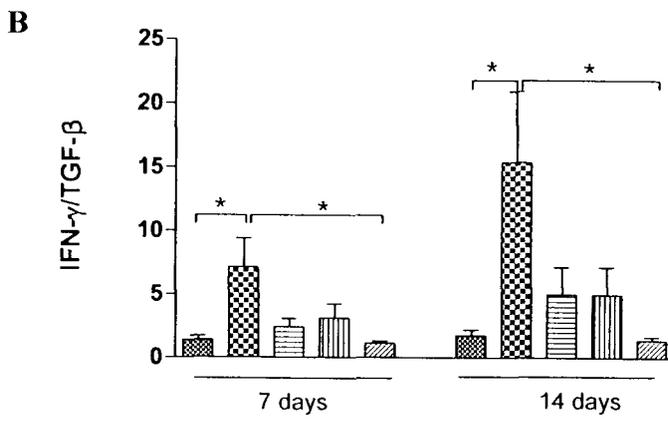
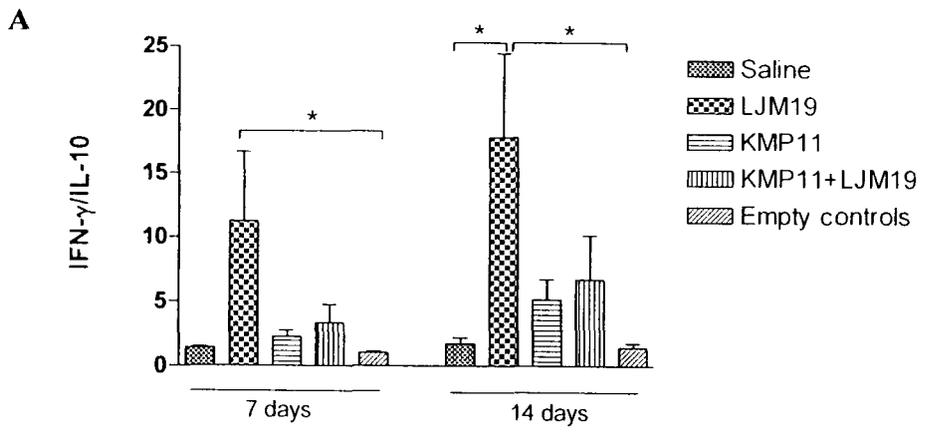


Figure 4

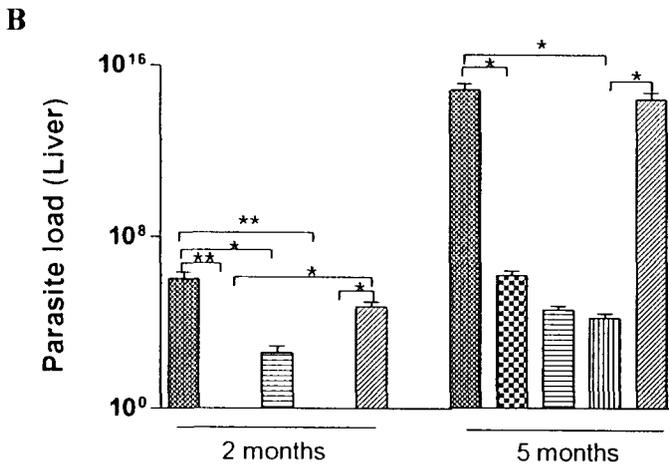
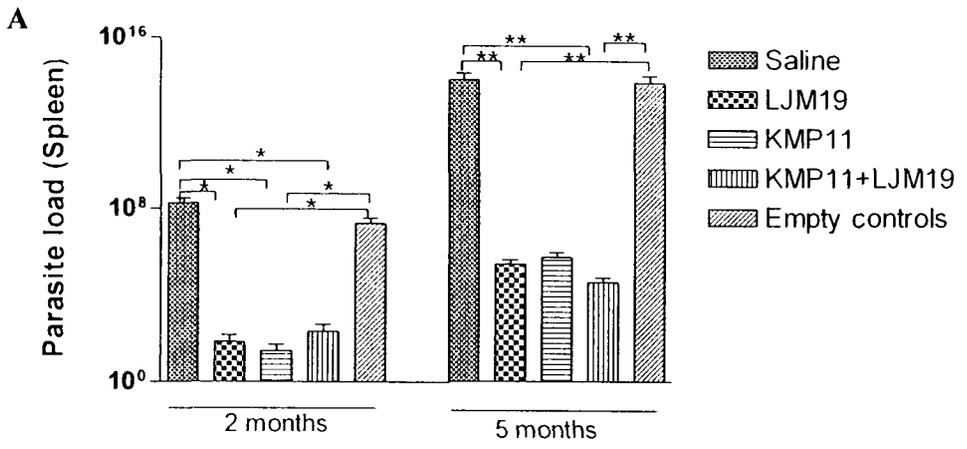


Figure 5

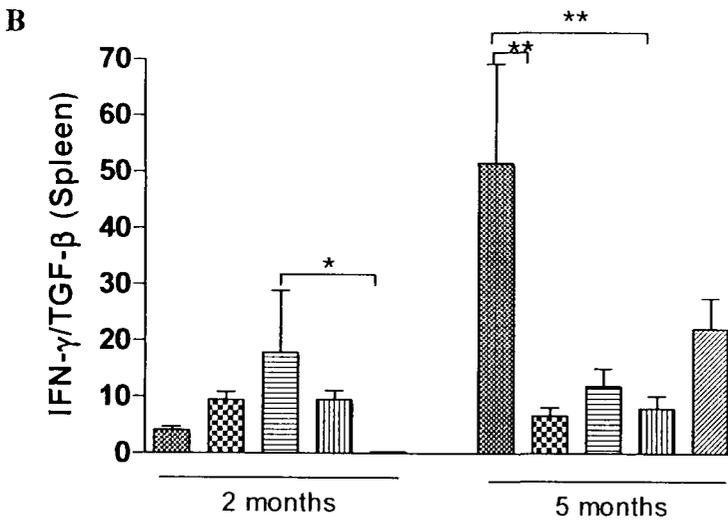
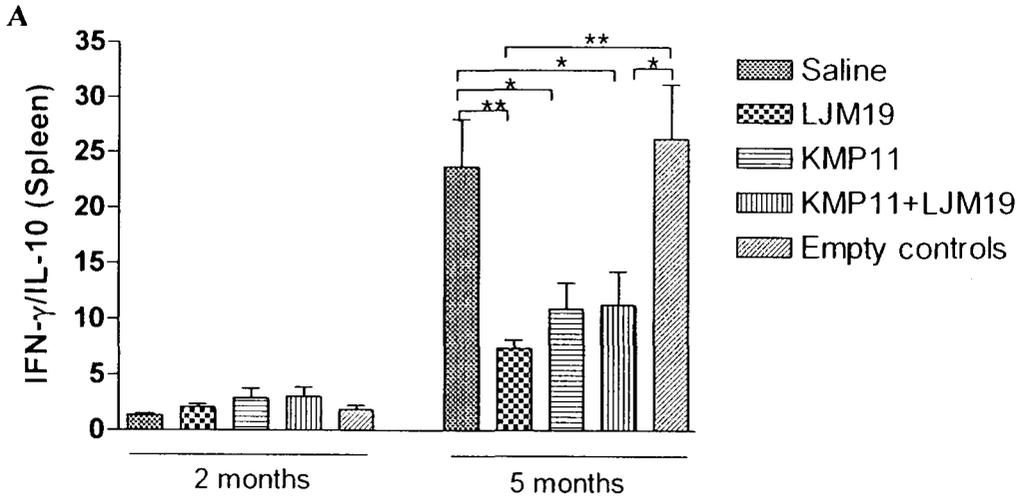
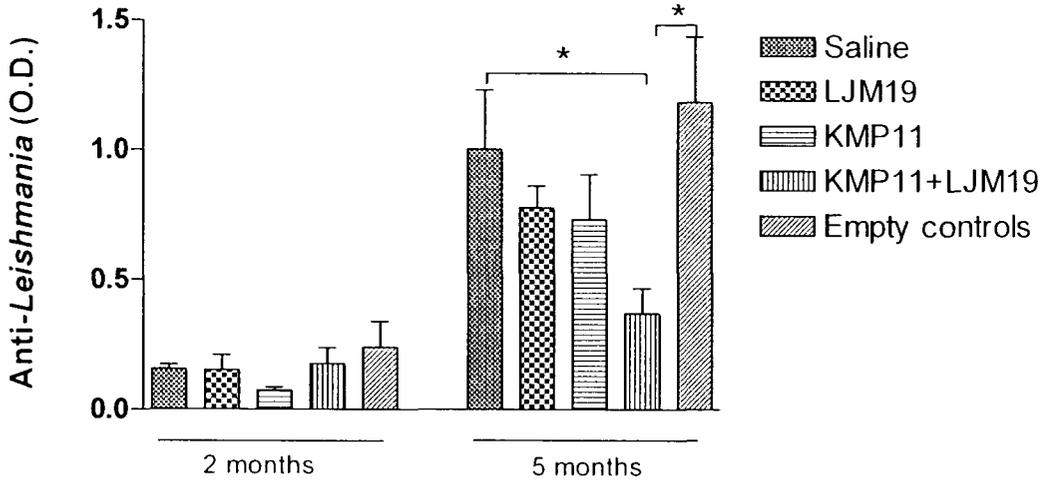


Figure 6

A



B

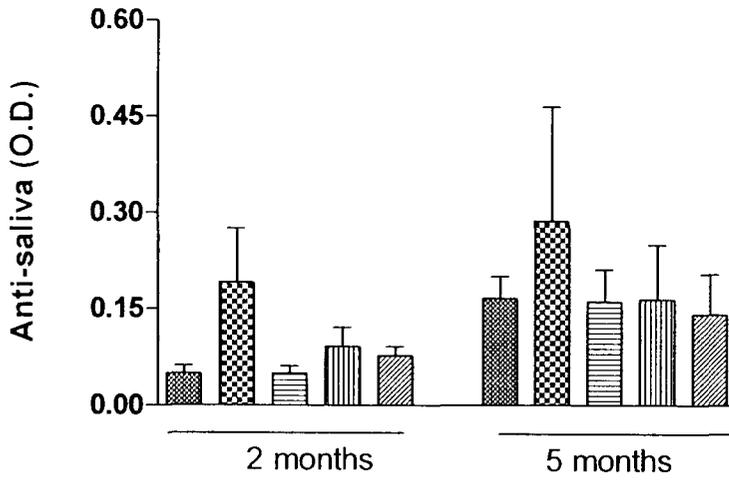


Table 1

	Healthy		Saline		LJM19		KMP11		KMP11+LJM19		Empty controls	
	2 months	5 months	2 months	5 months	2 months	5 months	2 months	5 months	2 months	5 months	2 months	5 months
Red blood cells (10⁶)	8.5±0.1	8.1±0.1	6.8±0.4*	8.4±0.2	8.4±0.2	8.2±0.1	7.7±0.4	7.8±0.2	8.5±0.3	7.8±0.2	6.9±0.4*	
Hemoglobin (g%)	16.1±0.4	14.9±0.3	13.2±1.1*	16.2±0.4	14.9±0.5	16.1±0.2	14.1±0.7	14.4±0.4	15.8±0.4	14.5±0.7	13.1±0.6*	
Hematocrit (%)	47.5±0.6	45.1±0.5	37.3±1.7*	45.8±1.0	47.6±1.6	46.4±0.6	47.7±2.1	43.7±1.2	47.9±1.9	43.6±1.2	37.6±2.2*	