



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da imunidade protetora conferida pela imunização de hamsters com saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* contra desafio com *Leishmania braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores.

NATALIA MACHADO TAVARES

Salvador
2008



NATALIA MACHADO TAVARES

Avaliação da imunidade protetora conferida pela imunização de hamsters com saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* contra desafio com *Leishmania braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof. Dr^a Cláudia Ida Brodskyn

Aprovada em 06 de agosto de 2008, pela Comissão Examinadora.

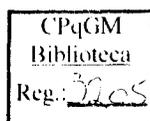
COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Cláudia Ida Brodskyn
Orientadora
Pesquisadora Associada da Fundação Oswaldo Cruz – CPqGM

Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida
Examinador 1
Pesquisador Associado do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Songeli Menezes Freire
Examinadora 2
Professora Adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

SALVADOR



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

T231a Tavares, Natália Machado
Avaliação da imunidade protetora conferida pela imunização de hamsters com saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* contra desafio com *Leishmania brasiliensis* na presença da saliva de diferentes vetores / Natália Machado Tavares. –2008.
90 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Moniz, 2008.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Ida Brodskyn.

1.Leishmania Brasiliense. 2. Lutzomyia longipalpis 3. Imunização. 4. Vacina. I.Título.

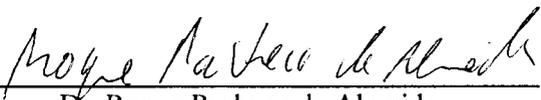
CDU 616. 993.161 : 614. 47

"AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA CONFERIDA PELA IMUNIZAÇÃO DE HAMSTERS COM SALIVA DO FLEBOTOMÍNEO *Lutzomyia longipalpis* CONTRA DESAFIO COM *Leishmania braziliensis* NA PRESENÇA DA SALIVA DE DIFERENTES VETORES"

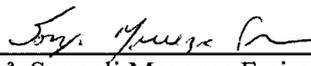
NATÁLIA MACHADO TAVARES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Professor Adjunto
UFS



Dr. Songeli Menezes Freire
Professora Adjunta
UFBA



Dr.ª Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ

*Para meus pais, Angela e Américo,
que sempre foram minhas referências.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr^a. Cláudia Ida Brodskyn, pela orientação;

Aos Profs. Dr. Manoel Barral-Netto e Dr. Aldina Barral, pelo acolhimento no laboratório;

À Prof. Dr^a. Camila Indiani de Oliveira, pelas sugestões;

Aos professores da Pós-Graduação em Patologia;

Ao Dr. José Carlos Miranda e aos integrantes do insetário, pelo fornecimento das glândulas;

Aos colegas de equipe Robson Amaro e Dirceu Costa, pela ajuda constante;

Às estudantes de iniciação científica Maiana Pitombo e Larissa Barbosa, pela dedicação;

À Kyioshi Futukani, pela ajuda molecular;

À Bruno Benzerril, pelas discussões;

À todos os integrantes e amigos do LIM1-LIP;

À minha família, pela compreensão;

À Pablo Oliveira, pelo companheirismo;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

ABSTRACT

Transmitted by different species of sand flies, leishmaniasis presents a large spectrum of clinical manifestations. It has been shown the possibility of immunizing against *Leishmania* infection using *Lutzomyia longipalpis* saliva. *Lutzomyia intermedia* is the main vector of *Leishmania braziliensis*. We investigated here whether the immunization of hamsters with *L. longipalpis* saliva confers protection against *L. braziliensis* infection in the presence of *L. intermedia* saliva. Old male hamsters were immunized with *L. longipalpis* Salivary Gland Sonicate (SGS) three times, at fifteen-day intervals. Fifteen days after last immunization, the animals were challenged on the lateral ear with 10^5 *L. braziliensis* promastigotes plus SGS from *L. intermedia*. Lesion development was measured weekly and 3, 5 and 8 weeks, after challenge, ears and draining lymph nodes were obtained to evaluate parasite load as well as cytokines produced during the infection. Forty-eight hours after challenge with SGS, we observed an inflammatory infiltrate predominantly composed of mononuclear cells in the ears of immunized hamsters. These animals showed also significantly lower number of parasites in the ear and in the draining lymph nodes. They also produced significantly more antibodies against saliva when compared with non-immunized hamsters and less antibodies anti-*Leishmania*. The possible mechanism under this response is the reduced levels of IL-10 and TGF- β during the infection. These results suggest that the immunization with SGS from *L. longipalpis* confers protection against *L. braziliensis* infection in an independent way of the presence of saliva in the challenge. Also, the possibility to vaccinate against different species of *Leishmania* using salivary proteins from only one sand fly species.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, *Lutzomyia longipalpis*, immunization, vaccine.

RESUMO

Transmitidas por diferentes espécies de flebotomos, as leishmanioses apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas. Tem sido demonstrada, a possibilidade de imunização contra a infecção por *Leishmania* utilizando-se a saliva do vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. O principal vetor da *Leishmania braziliensis* é o flebotomo *Lutzomyia intermedia*. O objetivo deste estudo foi avaliar se a imunização de hamsters com a saliva de *L. longipalpis* confere proteção contra a infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia*. Hamsters machos foram imunizados com o Sonicado de Glândula Salivar (SGS) por três vezes com intervalo de quinze dias. O desafio foi feito na orelha contra-lateral quinze dias após a última imunização, com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença do SGS de *L. intermedia*. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente e 3, 5 e oito semanas, após o desafio, as orelhas e linfonodos drenantes foram retirados para avaliação da carga parasitária, bem como da produção de citocinas durante a infecção. Quarenta e oito horas após o desafio com SGS, observa-se um infiltrado inflamatório composto predominantemente de células mononucleares nas orelhas dos animais imunizados. Estes animais apresentam redução significativa na carga parasitária dos linfonodos drenantes, bem como das orelhas desafiadas. Além disso, produzem significativamente mais anticorpos anti-saliva quando comparados aos não-imunizados e menos anticorpos anti-*Leishmania*. Os possíveis mecanismos envolvidos nesta proteção são os níveis reduzidos na expressão de IL-10 e TGF- β ao longo da infecção. Estes resultados sugerem que a imunização com o SGS de *L. longipalpis* confere proteção contra a infecção por *L. braziliensis* de modo inespecífico à presença da saliva no momento do desafio. Dessa forma, a possibilidade de vacinação contra diferentes espécies de *Leishmania*, utilizando proteínas salivares de uma espécie de vetor.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, *Lutzomyia longipalpis*, imunização, vacina.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
1	Avaliação do DTH em cortes histológicos das orelhas de hamster. Os animais foram imunizados ou não por 3 vezes com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por via intradérmica na orelha com intervalo de 15 dias. O desafio foi realizado na orelha contralateral com SGS de <i>L. longipalpis</i> (0,5 pares) ou de <i>L. intermedia</i> (1 par).	39
2	Produção de anticorpos específicos no soro contra saliva por ELISA em hamsters imunizados por via intradérmica três vezes na orelha com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares ou injetados do mesmo modo com solução salina com intervalo de 15 dias entre cada imunização.	40
3	Desenvolvimento da lesão em hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares com intervalo de 15 dias e desafiados na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de diferentes vetores.	42
4	Avaliação da carga parasitária na orelha de hamsters imunizados ou não 3 vezes com intervalo de 15 dias com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha contralateral com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de diferentes vetores pelo método de Diluição Limitante.	44
5	Avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante de hamsters imunizados ou não 3 vezes com intervalo de 15 dias com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha contralateral com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de diferentes vetores pelo método de Diluição Limitante.	46
6	Produção de anticorpos específicos contra saliva de <i>L. longipalpis</i> no soro de hamsters imunizados ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de diferentes vetores avaliada por ELISA.	48
7	Produção de anticorpos específicos contra <i>Leishmania</i> no soro de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> na presença da saliva de diferentes vetores avaliada por ELISA.	50
8	Avaliação dos níveis de expressão de IFN- γ por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores.	52
9	Avaliação dos níveis de expressão de IL-10 por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores.	54
10	Avaliação dos níveis de expressão de TGF- β por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores.	56
11	Desenvolvimento da lesão em hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias e desafiados na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	57

12	Avaliação da carga parasitária em hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> pelo método de Diluição Limitante.	58
13	Avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> pelo método de Diluição Limitante.	59
14	Produção de anticorpos específicos contra a <i>Leishmania</i> no soro de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> pelo método de ELISA.	60
15	Avaliação dos níveis de expressão de IFN- γ por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral.	62
16	Avaliação dos níveis de expressão de IL-10 por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral.	64
17	Avaliação dos níveis de expressão de TGF- β por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de <i>L. longipalpis</i> equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> por via intradérmica na orelha contralateral.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM – Leishmaniose Cutânea Mucosa

LCD – Leishmaniose Cutânea Disseminada

DTH – Resposta de Hipersensibilidade Tardia do inglês “*Delayed-type Hypersensitivity*”

IFN- γ – Interferon Gamma

CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

RNA_m – RNA mensageiro

IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4

IL-5 – Interleucina-5

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

APC – Células Apresentadoras de Antígeno

MHC-I ou II – Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I ou II

Th1 ou 2 – Células T auxiliares 1 ou 2

NO – Óxido Nítrico

TGF- β – Fator Transformador do Crescimento-Beta

iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintetase Induzida

NOS2 – Enzima Óxido Nítrico Sintetase Tipo 2

PFR-2 – Proteína Paraflagelar Rod-2

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

SGS – Sonicado de Glândula Salivar

DETC – Células T Intraepiteliais do inglês "*Dendritic Epidermal T Cell*"s

cDNA – DNA complementar

IgG – Imunoglobulina G

PBS – Salina Fosfatada

ELISA – Ensaio de Imuno-Adsorção Ligado à Enzima

SBF – Soro Bovino Fetal

Tm – Temperatura de Anelamento

O.D. – Densidade Óptica

Q.R. – Quantificação Relativa

Lb – *Leishmania braziliensis*

Lulo – *Lutzomyia longipalpis*

Li – *Lutzomyia intermedia*

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	11
1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	11
1.2 <i>Leishmania</i> E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	12
1.3 LEISHMANIOSE E RESPOSTA IMUNE	14
1.4 HAMSTER COMO MODELO EXPERIMENTAL	17
1.5 A SALIVA DO FLEBÓTOMO	20
HIPÓTESE	25
OBJETIVOS	26
DESENHO EXPERIMENTAL 1	27
DESENHO EXPERIMENTAL 2	28
DESENHO EXPERIMENTAL 3	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença afeta dois milhões de pessoas em praticamente todos os continentes, com exceção da Oceania, e é endêmica em 88 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o planeta vivem sob risco de infecção, 12 milhões de pessoas estão infectadas e, a cada ano, cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos surgem, causando 57 mil mortes anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A infecção por *Leishmania* causa diferentes manifestações clínicas que estão relacionadas ao desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro e com a espécie da *Leishmania* (GRIMALDI, 1982).

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) era considerada uma endemia focal e rural até a década de 80 do século XX. No entanto, ocorreu uma expansão para regiões peri-urbanas, periferias de alguns centros urbanos e epidemias urbanas foram observadas em várias cidades nos últimos anos. A LVA ocorre com maior incidência na região Nordeste, somando 92% dos casos, 66% destes na Bahia, Maranhão, Ceará e Piauí. De modo similar, houve expansão geográfica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) após 1985, com aumento no coeficiente de detecção de 10,45/100.000 habitantes para 18,63/1000.000 habitantes, e, atualmente, há relatos da doença em todas as regiões do país. Com uma média anual de 28.568 casos, a região Norte apresentou as maiores incidências entre 1985 e 2005. Em 2001, por exemplo, a incidência foi de 93,84 casos por 100.000 habitantes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE / MS, 2001; 2003; 2005; 2007).

1.2 *Leishmania* E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário digenético, ou dimórfico, pertencente à ordem Kinetoplastidae, da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. A transmissão para o hospedeiro vertebrado é feita por meio da picada do vetor flebotomíneo fêmea infectado que, no momento do repasto sanguíneo, injeta, juntamente com a saliva, as formas promastigotas flageladas infectantes da *Leishmania*, denominadas metacíclicas. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes na derme via receptores e ligantes específicos, que se instalam no compartimento fagolisossomal dessas células (vacúolo parasitóforo) e se diferenciam em amastigotas. Estes parasitas sobrevivem e multiplicam-se por divisão binária simples até a destruição da célula hospedeira, quando são liberados e novamente fagocitados. Ao se alimentar de um vertebrado infectado, o flebótomo aspira células, dentre elas, macrófagos infectados com formas amastigotas, e componentes da matriz extracelular. Uma vez no interior do flebótomo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas e se deslocam para a porção anterior do intestino do vetor, onde são novamente inoculados no momento do repasto sanguíneo (HOWARD *et al.*, 1980; LAINSON *et al.*, 1987; MOSSER, 1994; SACKS & KAMHAWI, 2001).

As formas clínicas das leishmanioses são, basicamente, visceral e tegumentar, sendo a visceral uma forma grave e fatal, se não tratada. Esta consiste de infecção generalizada que acomete o sistema reticuloendotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). A LTA apresenta um espectro de manifestações clínicas como a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), a Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM), Leishmaniose Cutânea Difusa e Disseminada (LCD). De modo geral, a LTA é caracterizada pela formação de úlcera na pele em locais expostos à picada do vetor, como rosto, braços e pernas. Lesões cutâneas únicas ou múltiplas podem ocorrer, sendo mais freqüente a úlcera indolor, de borda elevada e fundo necrótico que pode curar espontaneamente. Primariamente, a LTA compromete a pele, mas a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento das lesões cutâneas (BARRAL *et al.*, 1995). O desenvolvimento destas diferentes manifestações clínicas da doença depende de interações complexas que envolvem desde a capacidade infectiva da espécie de *Leishmania* em questão até o estado imunológico do hospedeiro (PEARSON & SOUSA, 1996).

A LTA é causada por uma variedade de espécies. Nas Américas, seus principais agentes etiológicos são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*, enquanto *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* são responsáveis por esta manifestação clínica no Velho Mundo (LAINSON *et al.*, 1987). No Brasil, a LCL tem como agentes etiológicos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

1.3 LEISHMANIOSE E RESPOSTA IMUNE

De modo geral, as leishmanioses são agrupadas em dois pólos de acordo com a resposta imune. O pólo responsivo é representado pela LCL e LCM, nas quais os pacientes apresentam forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), caracterizando imunidade mediada por células, e alta produção de interferon γ (IFN- γ) em resposta ao antígeno de *Leishmania in vitro*. Entretanto, há baixa produção de anticorpos (CARVALHO *et al.*, 1985; CASTES *et al.*, 1983). O outro pólo não responsivo é representado pela LCD. Neste caso, a imunidade humoral se manifesta de forma predominante (CONVIT *et al.*, 1972) e, durante a fase aguda da doença, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) não expressam RNAm para IFN- γ , enquanto expressam para IL-2, IL-4 e IL-10 (BOMFIM *et al.*, 1996). Além disso, avaliando a resposta linfoproliferativa, após estimulação *in vitro* com antígeno de *Leishmania*, não há produção de IFN- γ por estas células (MURRAY *et al.*, 1984).

Embora estes achados tenham surgido de análises com seres humanos, modelos experimentais são amplamente utilizados em estudos sobre imunorregulação na infecção por *Leishmania*. Os padrões de susceptibilidade e resistência à leishmaniose cutânea foram desenvolvidos a partir dos perfis de ativação de clones de célula T CD4⁺. Uma vez que a *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado, a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras (APC), como macrófagos e células dendríticas, se dá via moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC-II), daí a importância dessas células na resposta à infecção. As vias de ativação das células T CD8⁺ ainda são controversas, uma vez que a *Leishmania* reside nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, não está claro como estas células apresentam antígenos às células T CD8⁺ através do MHC-I (RUIZ & BECKER, 2007). No entanto, existem relatos deste fato. Kima e colaboradores demonstraram, em 1997, que células T CD8⁺ específicas para um antígeno de superfície de *L. amazonensis*, foram capazes de reconhecer macrófagos infectados (KIMA *et al.*, 1997). Mais recentemente, células T CD8⁺ foram ativadas *in vitro* por DCs infectadas com *L. major* (BERTHOLET *et al.*, 2005). Ainda não está esclarecido como estes antígenos de *Leishmania* saem dos vacúolos parasitóforos e atingem o citosol, onde são processados para apresentação pela via MHC-I. Um possível mecanismo é a apresentação cruzada, que é baseado na fusão do fagossomo com o retículo

endoplasmático, de onde os antígenos podem ser transportados para o citosol (HOUDE *et al.*, 2003; GUERMONPREZ *et al.*, 2003).

A ativação das células T pela interação com APCs resulta na produção de citocinas e na proliferação celular (FRASER & WEISS, 1992; LINSLEY *et al.*, 1992; FEEMAN *et al.*, 1993). A partir do perfil de secreção dessas citocinas distinguem-se dois tipos de linfócitos TCD4⁺: T helper 1 (Th1) e 2 (Th2). O primeiro é caracterizado pela alta produção de IFN- γ dependente de interleucina-12 (IL-12), com baixos níveis de IL-4, que induzem ativação de mecanismos microbicidas dos macrófagos infectados e morte de parasitas, mediado, principalmente por óxido nítrico (NO). Este é um padrão de resistência à infecção por *L. major* observado em camundongos da linhagem C57BL/6 e que desenvolvem apenas uma pequena lesão no local do inóculo, que não ulcera e cura espontaneamente. Em contraste, camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis à infecção por desenvolverem uma resposta na qual os linfócitos produzem inicialmente altos níveis de IL-4, com redução na produção de IFN- γ e IL-12. A lesão desses animais não cura espontaneamente, é ulcerada e necrótica (REINER & LOCKSLEY, 1995; ETGES & MULLER, 1998; ROGERS *et al.*, 2002; LOCKSLEY & SCOTT, 1991).

Apesar das diferenças evidentes da infecção entre animais resistentes e susceptíveis, os estágios iniciais parecem ser semelhantes. Há predominância de neutrófilos, muitos contendo parasitas no seu interior, enquanto macrófagos e eosinófilos ocorrem em menor número. De forma gradual há uma substituição deste perfil celular por outro que difere entre as linhagens de camundongos. Naqueles de linhagem susceptível, há substituição por um aspecto monofórmico constituído predominantemente de macrófagos vacuolados repletos de amastigotas, enquanto é observado um infiltrado de linfócitos, plasmócitos e reação granulomatosa, em animais das linhagens resistentes (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987).

A permanência de amastigotas no interior dos vacúolos fagolisossomais dos macrófagos, que consistem em microambientes desfavoráveis à sobrevivência de microorganismos, envolve adaptações bioquímicas e morfológicas desses parasitas para que consigam sua sobrevivência e multiplicação. Os mecanismos envolvidos na resistência da *Leishmania* neste ambiente tóxico ainda não foram completamente definidos

(ALEXANDER *et al.*, 1999). No entanto, alguns trabalhos apontam para a importância do equilíbrio entre citocinas na sobrevivência da *Leishmania*. O Fator Transformador do Crescimento Beta (TGF- β , do inglês *Transforming growth factor-beta*) foi demonstrado como predominante em animais de linhagem susceptível à infecção por *Leishmania* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). O papel do TGF- β na infecção por *Leishmania* também foi demonstrado por estudos com modelos experimentais *in vitro*. A partir de culturas de macrófagos, observou-se que a adição de TGF- β levou ao aumento da replicação de *L. braziliensis*, enquanto a administração do anticorpo neutralizante anti-TGF- β levou à diminuição da infecção. Além disso, animais submetidos ao tratamento com TGF- β fez com que parasitas avirulentos se tornassem virulentos e levou à reativação da infecção latente por *L. braziliensis* (BARRAL *et al.*, 1993). Outras citocinas também estão envolvidas na modulação da leishmaniose murina, como demonstrado por Murphy e colaboradores em 2001, que utilizando camundongos deficientes em IL-10 observaram maior resistência à infecção por *L. donovani* devido ao aumento na produção de IFN- γ e IL-12 nesses animais. De fato, a presença de IL-10 levava à forma ativa da doença e não a ausência de IFN- γ (MURPHY *et al.*, 2001). Portanto, é possível que este equilíbrio entre respostas Th1 e Th2 esteja implicado no variado espectro de manifestações clínicas da leishmaniose.

Outros mecanismos de defesa do hospedeiro também estão envolvidos na sobrevivência da *Leishmania* no interior dos vacúolos parasitóforos de macrófagos. A fagocitose de promastigotas por macrófagos ou neutrófilos seguida pela liberação de enzimas hidrolíticas ou intermediários reativos do oxigênio (explosão respiratória do inglês “*oxidative burst*”) são exemplos de mecanismos que são ativados em minutos ou segundos na tentativa de conter a infecção ainda nos momentos iniciais. Durante estágios mais tardios, outros mecanismos são ativados, porém, requerem a indução da transcrição ou síntese “de novo” de proteínas e, dessa forma, não são tão importantes no controle inicial da infecção. A produção de óxido nítrico (NO), por exemplo, um gás inorgânico secretado por células de mamíferos envolvido na homeostase e defesa do hospedeiro, que é feita pela enzima NO sintase induzida ou tipo II (iNOS ou NOS2, respectivamente), é outro mecanismo importante envolvido no controle do parasita (NATHAN, 1992).

1.4 HAMSTER COMO MODELO EXPERIMENTAL

Desde a segunda metade do século XX, diversos grupos de pesquisadores utilizam hamsters como reservatório de espécies de *Leishmania* para manutenção deste parasito em seus laboratórios. Na tentativa de encontrar animais selvagens possivelmente hospedeiros de *Leishmania*, Thatcher e colaboradores, em 1965, inocularam diferentes cepas de *Leishmania* ssp. isoladas de lesões cutâneas de pacientes que viviam em áreas endêmicas da América Latina, em diversas espécies de roedores e marsupiais coletados em florestas (THATCHER *et al.*, 1965). No entanto, estes pesquisadores já tinham conhecimento sobre a susceptibilidade do hamster (ou *golden hamster*, *Mesocricetus auratus*) e utilizavam-no para manutenção de parasitas através de passagens nestes animais (LAINSON & STRANGWAYS-DIXON, 1964; THATCHER *et al.*, 1965). Somente no final da década de 70 do século XX que se deu início ao estudo da leishmaniose cutânea experimental em hamster com o objetivo de investigar questões relacionadas à imunidade, diagnóstico e transmissão da doença. Neste período pouco era sabido sobre o desenvolvimento da infecção experimental em hamster com quaisquer espécies de *Leishmania*. Por isso, as diversas vias de administração do parasito, tanto em forma amastigota quanto promastigota, e seu inóculo para o estabelecimento da infecção foram testados (WILSON *et al.*, 1979; HERRER *et al.*, 1979). A controvérsia sobre a ocorrência de lesões metastáticas em decorrência à infecção por *L. braziliensis* foi amplamente testada em hamsters (WILSON & LOLLINI, 1980; TRAVI *et al.*, 1988; ALMEIDA *et al.*, 1996; SINAGRA *et al.*, 1997). O hamster também é utilizado como modelo em identificação da espécie do agente causador da infecção através do inóculo de material de biópsia de lesões cutâneas e posterior observação do desenvolvimento da doença (ROMERO *et al.*, 2001). A avaliação da infectividade de diferentes subespécies também pode ser feita utilizando-se hamster (REY *et al.*, 1990). Dentre estes trabalhos, Wilson e colaboradores, em 1979, demonstraram que a rota intradérmica de administração de 10^2 parasitas tinha o mesmo efeito que a via subcutânea de 10^6 amastigotas de *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Os autores sugerem que a primeira via seria ideal para padronizar o modelo experimental em hamsters pela possibilidade de detectar infecção num tempo cinco vezes menor, além de mimetizar melhor a infecção natural (WILSON *et al.*, 1979).

A resposta imune de hamsters a infecções causadas por parasitas intracelulares é pouco estudada. Um dos primeiros estudos a tratar sobre a imunidade em resposta à *L. donovani* em hamster demonstrou a causa da hipergamaglobulinemia. Este trabalho aponta que sua origem está relacionada com uma forte ativação policlonal de células B que induz a secreção de imunoglobulinas (CAMPOS-NETO & BUNN-MORENO, 1982). Ainda assim, a maioria dos grupos de pesquisa demonstrava interesse no estudo da susceptibilidade de hamster a diferentes espécies de *Leishmania* (NEAL & HALE, 1983; KAHL *et al*, 1990; 1991; SINAGRA, 1997). Portanto, estes trabalhos se restringiam a estudar aspectos clínicos da leishmaniose em hamster em detrimento do tipo de resposta imune que estes animais desenvolviam.

Apesar das dificuldades encontradas na utilização dos hamsters, como ausência de reagentes, eles têm sido amplamente empregados como modelo experimental no estudo da leishmaniose visceral por conta da sua alta susceptibilidade (MIKHAIL & MANSOUR, 1975; FARRELL, 1976; COOK *et al*, 1982; JARECKI-BLACK *et al*, 1984; AFRIN & ALI, 1997; AFRIN *et al*, 2000; GARG *et al*, 2005; BASU *et al*, 2005). Da mesma forma, os hamsters são altamente susceptíveis às espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea (BASTIEN & KILLICK-KENDRICK, 1992), quando comparados com camundongos (DE MOURA *et al*, 2005). Por conta desta maior susceptibilidade, alguns grupos de pesquisa adotam os hamsters como modelo experimental em estudos sobre possíveis vacinas contra leishmaniose cutânea. Um dos primeiros trabalhos a utilizar modelos não-murinos para avaliar a capacidade protetora de uma vacina contra leishmaniose tegumentar imunizava hamsters com *L. braziliensis* quimicamente tratada. O desafio era feito em seguida com a mesma espécie. Estes animais apresentaram resposta de células T e B mais eficiente, ausência de parasitas no linfonodo na sexta semana após a infecção e tamanho de lesão cerca de quatro vezes menor em relação aos animais controles. Além disso, por volta da décima semana pós-infecção, as lesões eram indetectáveis (O'DALY & CABRERA, 1986). Apesar dos resultados promissores, a vacinação de hamsters contra leishmaniose cutânea voltou a ser objeto de estudo somente do início do século XXI, quando foi demonstrada a imunogenicidade da proteína paraflagelar Rod-2 (PFR-2). O potencial protetor desta proteína, bem como do gene codificante, foram avaliados contra *L. mexicana* e *L. panamensis* de acordo com a via de inoculação e o gênero do hospedeiro. Resultados divergentes foram obtidos, onde houve

proteção conferida pela imunização com a proteína recombinante, mas fêmeas submetidas à vacinação genética e desafiadas com *L. mexicana* apresentaram tamanho de lesão exacerbado (SARAVIA *et al*, 2005). Diante disso, fica evidente a necessidade de mais estudos para aperfeiçoar a resposta protetora conferida por esta proteína na construção de uma vacina. Este mesmo grupo de pesquisa também avaliou a vacinação de hamsters com *L. mexicana* atenuada por mutação gênica seguida pelo desafio com a mesma espécie de *Leishmania* selvagem. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que os animais imunizados apresentaram tamanho de lesão menor do que os controles (SARAVIA *et al*, 2006). Novamente, a possibilidade de desenvolver uma vacina contra leishmaniose é demonstrada e esta pode ocorrer através da utilização de diferentes metodologias.

Os estudos sobre potenciais candidatos à vacina contra leishmaniose compõem a principal linha de pesquisa de muitos grupos. Diversos protocolos foram testados em modelos murinos com objetivo de identificar e isolar antígenos protetores. Scott e colaboradores demonstraram em 1990 que a transferência adotiva de clones de célula T específicas para as frações de promastigotas de *L. major*, bem como para antígenos solúveis de *Leishmania*, confere proteção contra este parasito (SCOTT *et al*, 1990). De forma similar, a vacinação única com bacilo Calmette-Guérin (BCG) recombinante expressando a proteinase gp63 de *Leishmania* protegeu os animais contra o desafio com *L. major* e *L. mexicana* (CONNELL *et al*, 1993). Também foi testada a imunização de animais com parasitos atenuados por irradiação inoculados por via subcutânea, conferindo alto grau de proteção contra *L. major* (RIVIER *et al*, 1993). Mais recentemente, surgiu a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina baseada na saliva do vetor da *Leishmania* com a demonstração de que animais picados por flebotomos não infectados são protegidos contra o desafio com *L. major*. Essa proteção é conferida por forte DTH e produção de IFN- γ no local do desafio (KAMHAWI *et al*, 2000). Todos estes estudos demonstram que o desenvolvimento de uma vacina contra a forma cutânea da leishmaniose é plausível.

1.5 A SALIVA DO FLEBÓTOMO

Os flebotomíneos são invertebrados pertencentes à classe Insecta, da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Esta subfamília possui cinco gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* que são encontrados no Velho Mundo; *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo (LEWIS, 1971; 1974). No Novo Mundo, o gênero *Lutzomyia* tem maior importância por ser representado por centenas de espécies das quais, muitas respondem pela transmissão de *Leishmania*, causando as diferentes manifestações clínicas (LEWIS, 1971; 1974; FORATTINI *et al.*, 1973; KILLICK-KENDRICK, 1990). Estes insetos vivem sem contato com o homem, porém, devido à intensa ação antrópica no seu hábitat, muitas espécies estão bem adaptadas ao convívio com animais domésticos e o homem. Uma das espécies mais bem adaptadas é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que é encontrado em alta densidade em algumas regiões do Brasil, interna e externamente aos domicílios (SHERLOCK, 1996).

Poucas espécies de flebotomíneos conseguem sobreviver em regiões além dos trópicos, sendo, portanto predominantes em regiões neotrópicas (MARTINS & MORALES-FARIAS, 1972). Flebotomíneos adultos se alimentam de várias substâncias doces de natureza vegetal, tais como seiva, néctar e frutas maduras. Além do açúcar encontrado nos vegetais, as fêmeas necessitam exercer a hematofagia a fim de amadurecer seus ovos (LEWIS, 1971; FORATTINI, 1973). Na obtenção de sangue, os flebotomíneos dilaceram pequenos vasos criando uma pequena hemorragia e dela alimentam-se (GOLDMAN *et al.*, 1952). Durante a alimentação, a saliva é injetada antes do ato hematofágico, o que auxilia no encontro de um local adequado para o repasto sanguíneo e na contenção dos mecanismos hemostáticos. Estes insetos possuem um par de glândulas salivares situado na região ventral protorácica, constituído de um ducto comum curto e um ducto individual longo que vai até o aparato bucal (FORATTINI, 1973). O volume da saliva secretado é particular de cada espécie e é composto de várias substâncias com capacidade antihemostática. Dentre estas substâncias encontram-se moléculas vasodilatadoras, anticoagulantes e antiplaquetárias, que permitem o sucesso da alimentação pelo flebótomo (RIBEIRO *et al.*, 1994).

O papel desses componentes salivares torna-se relevante no estudo da patogênese de doenças transmitidas por artrópodes, uma vez que a picada é a principal via de transmissão de diversos parasitas. Portanto, a capacidade vetorial é dependente da presença total ou até mesmo parcial da saliva, para que o vetor consiga realizar o repasto sanguíneo e, assim, efetuar a transmissão do parasita (RIBEIRO *et al.*, 1998; RIBEIRO, 2000).

O conteúdo salivar dos flebotomíneos apresenta grande relevância parasitológica, pois as propriedades imunomoduladoras propiciam ambiente adequado à sobrevivência e multiplicação dos microorganismos transmitidos durante o repasto. A saliva, quando inoculada experimentalmente com parasitas do gênero *Leishmania* pode promover infecção mais grave em relação ao inóculo constituído somente de parasitas (TITUS; RIBEIRO, 1988; LIMA; TITUS, 1996; BELKAID *et al.*, 1998; DONNELLY *et al.*, 1998; BEZERRA & TEIXEIRA, 2001). Este efeito exacerbador na infecção pode ser ainda observado quando a saliva é inoculada até quatro dias antes da inoculação dos parasitas (THEODOS & TITUS, 1993). Diversos estudos demonstraram o papel regulador da saliva dos flebotomíneos sobre atividades microbicidas das células fagocíticas, macrófagos principalmente, que favorece a infecção e a multiplicação dos microorganismos intracelulares. Estas células, em contato com a saliva, têm sua produção de óxido nítrico e peróxidos reduzidas, criando um ambiente favorável à multiplicação dos microorganismos endocitados (TITUS; RIBEIRO, 1988; JAMES; ROSSIGNOL, 1991; THEODOS; TITUS, 1993; HALL & TITUS, 1995; WAINUBI; WARBURG, 1998; CHARLAB *et al.*, 1999; GILLESPIE *et al.*, 2000).

Uma vez que a saliva de flebotomíneos é constituída por grande quantidade de proteínas, o hospedeiro desenvolve resposta imune (celular ou humoral) contra seus componentes. A resposta progride a partir de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH), seguida por uma reação de hipersensibilidade imediata com a exposição continuada, finalizando com ausência de reação do hospedeiro (MELLANDY, 1946). Esta resposta imune contra a saliva pode ser avaliada pela presença de anticorpos, bem como DTH contra diferentes proteínas salivares (BELKAID *et al.*, 1998; BELKAID *et al.*, 2000; BARRAL *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005; ROHOUSOVA *et al.*, 2005). Diversos trabalhos com modelos murinos e humanos expostos à picadas mostram que há produção de anticorpos anti-saliva, bem como uma intensa reação inflamatória contra os antígenos

salivares. Além disso, hospedeiros imunizados submetidos à picada de flebótomos ou à injeção do sonicado da glândula salivar (SGS) apresentam infiltrado de células inflamatórias no local da administração após 24 a 48 horas. Esta resposta facilitaria a alimentação do inseto, pois o fluxo sanguíneo ocorre com maior intensidade na área da reação em relação aos indivíduos não sensibilizados (BELKAID *et al.*, 2000).

O papel regulador da saliva de flebótomos foi demonstrado em trabalhos nos quais baixas doses de *Leishmania major* juntamente com saliva *L. longipalpis* ou *Phlebotomus papatasi* foram inoculadas em camundongos. Os animais apresentaram lesões de tamanho maior, bem como maior carga parasitária em relação aos animais desafiados somente com o parasita, enfatizando o caráter exacerbador dos componentes salivares. Em contrapartida, anticorpos produzidos em resposta à saliva podem neutralizar este efeito das proteínas salivares. Quando o soro dos animais sensibilizados foi incubado com SGS e posteriormente inoculado com parasitas, observou-se que as lesões foram menores em relação aos animais inoculados com parasitas e SGS incubado com soro de camundongos normais (TITUS & RIBEIRO, 1988; BELKAID *et al.*, 1998; SAMUELSON *et al.*, 1991; THEODOS *et al.*, 1991; WARBURG *et al.*, 1994; LIMA & TITUS, 1996).

Outro aspecto relevante é a via de administração dos parasitas. Utilizando um modelo intradérmico de infecção com inóculo constituído de baixas doses de *L. major* (500 a 1000 parasitas), feito na derme da orelha do camundongo, tenta-se mimetizar a biologia da transmissão natural (BELKAID *et al.*, 1998). A derme da orelha possui células como queratinócitos, células T intraepiteliais (DETC) e células de Langerhans, especializadas em responder à entrada de microorganismos (TAKASHIMA & BERGSTRESSER, 1996). Neste modelo, foram observados padrões de resistência e susceptibilidade a *L. major* nos camundongos C57BL/6 e BALB/C, respectivamente. Novamente, quando os parasitas foram inoculados na presença da saliva de *P. papatasi*, vetor natural da *L. major*, houve exacerbação da lesão, associada com aumento inicial da frequência de células epidérmicas produzindo citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5).

A demonstração de que componentes salivares de flebótomos podem modificar os efeitos da infecção levou à hipótese da utilização destas substâncias como alvos no controle da leishmaniose. Utilizando modelos murinos pré-sensibilizados com saliva

através de picadas de *P. papatasi* ou da inoculação de proteínas salivares do mesmo vetor, diversos trabalhos apontam a capacidade protetora da saliva pelo bloqueio do estabelecimento da infecção nesses animais desafiados com *L. major* na presença de saliva (BELKAID *et al.*, 1998; KAMHAWI *et al.*, 2000; VALENZUELA *et al.*, 2001). Essa proteção contra infecção por *Leishmania ssp* desenvolvida por uma resposta imune anti-saliva provavelmente se deve à neutralização dos componentes imunomodulatórios presentes na saliva. Um desses componentes é o maxadilan, peptídeo de 7kDa presente na saliva de *L. longipalpis*, que foi capaz de induzir o desenvolvimento de uma resposta imune protetora em camundongos contra um desafio com *L. major* na presença de saliva (LERNER & SHOEMAKER, 1992; MORRIS *et al.*, 2001). Além da neutralização dos componentes salivares pela pré-exposição à saliva, outro fator importante nesta resposta protetora seria a presença de células inflamatórias (DTH) no local da picada recrutadas em resposta aos componentes salivares. Este recrutamento de células inflamatórias tornaria o local da picada inapropriado para o estabelecimento da *Leishmania* no hospedeiro, por ser acompanhado da produção de citocinas do tipo Th1 (KAMHAWI *et al.*, 2000). De forma similar, a imunização de camundongos com a proteína SP15 de 15kDa, componente da saliva de *P. papatasi*, foi capaz de controlar a infecção com *L. major* na presença do SGS. Também a imunização com uma vacina de cDNA codificando a proteína SP15 foi capaz de proteger os camundongos contra o desafio com o parasita e SGS. Mesmo em camundongos deficientes de células B, o mesmo efeito foi observado, tanto para a imunização com a proteína purificada quanto com a vacina de cDNA (VALENZUELA *et al.*, 2001).

Em áreas endêmicas, as populações estão em íntimo contato com flebotomíneos não infectados, caracterizando a sensibilização natural destas pessoas à saliva do vetor. Crianças residentes em uma área endêmica para Leishmaniose Visceral que converteram DTH contra *Leishmania* num período de seis meses também apresentaram anticorpos IgG, de subclasse IgG1 e IgE, contra antígenos da saliva de *L. longipalpis*. No entanto, crianças que converteram somente a sorologia anti-*Leishmania* não apresentaram anticorpos anti-saliva, sugerindo que o desenvolvimento de uma resposta imune contra a saliva de *L. longipalpis* induziria uma resposta protetora contra a *Leishmania* (GOMES *et al.*, 2002).

A composição salivar, bem como sua função e antigenicidade parecem variar consideravelmente entre diferentes espécies de flebotomos (WARBURG *et al.*, 1994).

Dessa forma, torna-se importante determinar se existem componentes antigênicos comuns a todas as espécies relevantes para esta imunidade protetora contra *Leishmania*. Avaliando a possibilidade de proteção cruzada, Thiakaki e colaboradores, em 2005, demonstraram que soro de animais expostos naturalmente a picadas de *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti* e *L. longipalpis* continham anticorpos anti-saliva. No entanto, estes reconheciam principalmente antígenos específicos à sua respectiva espécie. Além disso, os animais foram menos susceptíveis contra *L. amazonensis* quando imunizados com SGS de *L. longipalpis*, mas não com SGS das outras espécies (THIAKAKI *et al.*, 2005). Embora nenhuma destas espécies seja o vetor natural da *L. amazonensis*, estes dados sugerem que a imunidade protetora mediada pela saliva contra *Leishmania* pode ser específica.

Diante disso, a hipótese deste trabalho é de que a imunização com a saliva de *L. longipalpis* protege contra infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores.

2 HIPÓTESE

A imunização de hamsters com sonicado de glândula saliva de *Lutzomyia longipalpis* protege contra infecção subsequente por *Leishmania braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia*, como ocorre na natureza.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o curso da infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores em hamsters imunizados com a saliva de *L. longipalpis*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a resposta imune induzida pela exposição aos componentes da saliva de *L. longipalpis*.

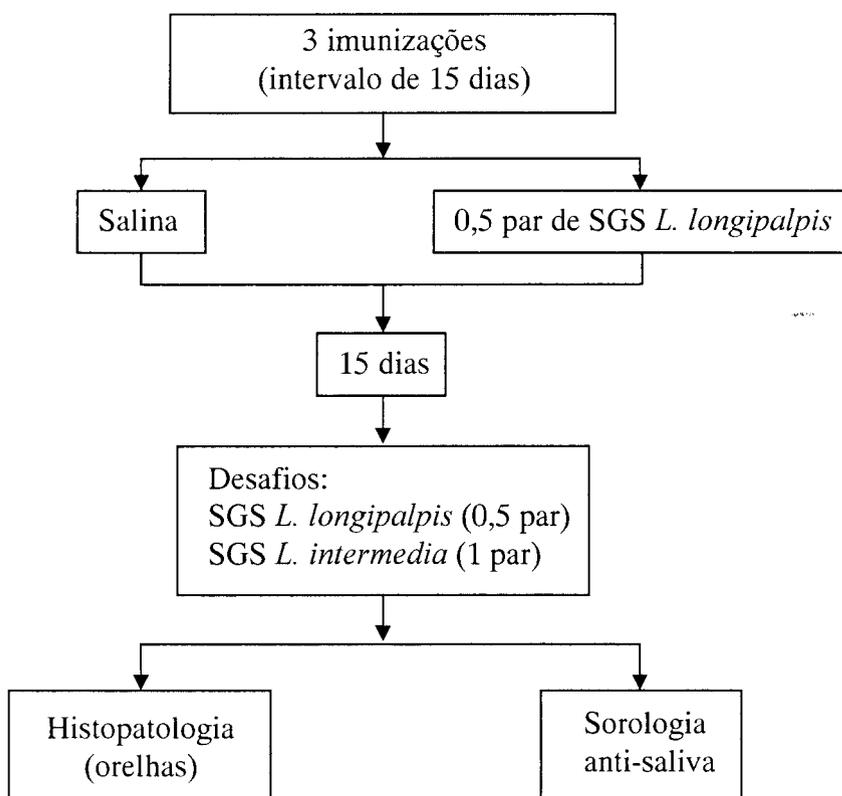
Avaliar o curso da infecção por *L. braziliensis* em hamsters imunizados com SGS de *L. longipalpis* e infectados na presença da saliva de *L. longipalpis* ou *L. intermedia*.

Avaliar se a pré-exposição aos componentes salivares de *L. longipalpis* interfere no curso da infecção por *L. braziliensis* na presença ou não da saliva de diferentes flebótomos.

Avaliar a especificidade da resposta imune gerada pela imunização com a saliva de *L. longipalpis*.

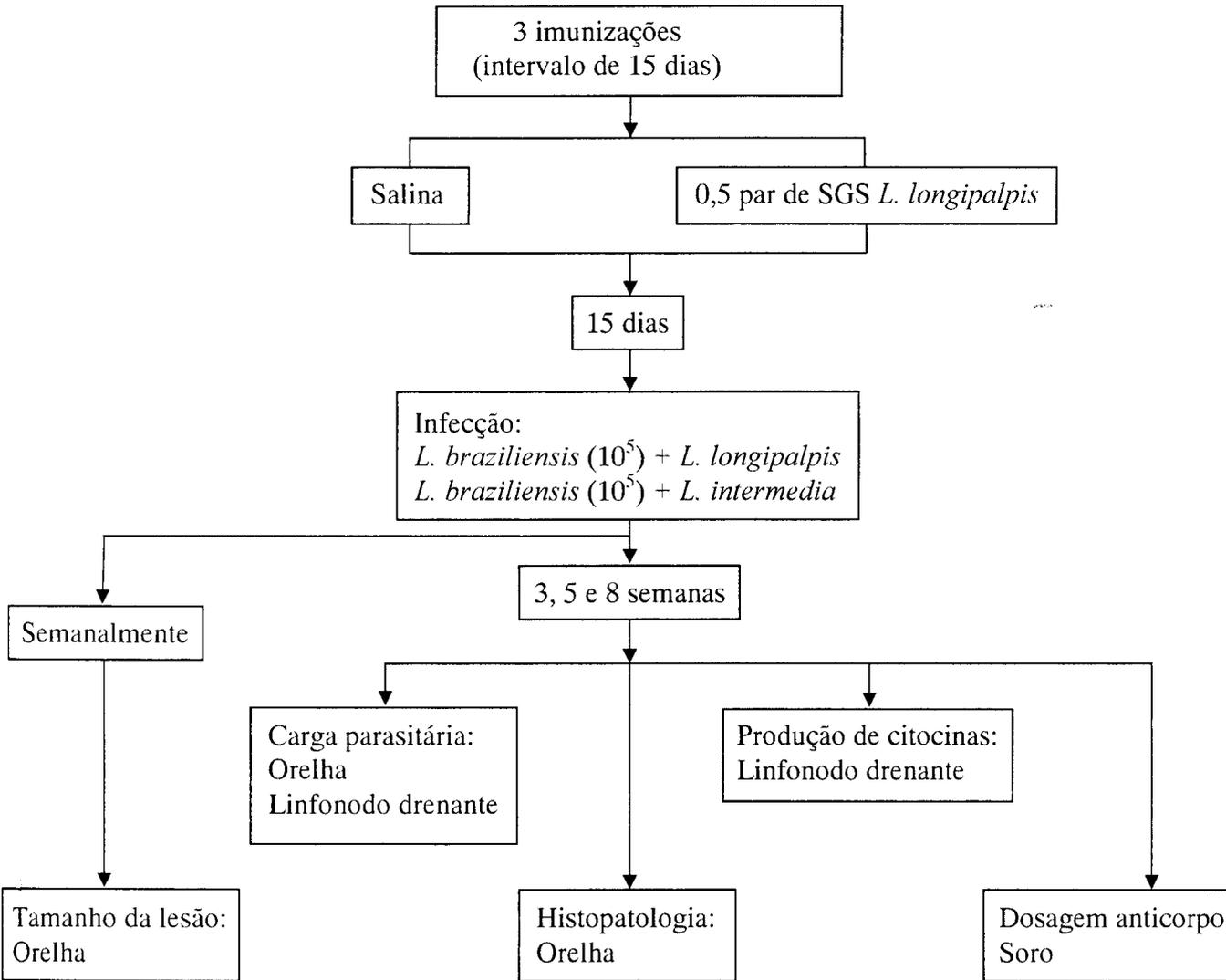
4 DESENHO EXPERIMENTAL - 1

Avaliar a resposta imune induzida pela exposição aos componentes da saliva de *L. longipalpis*.



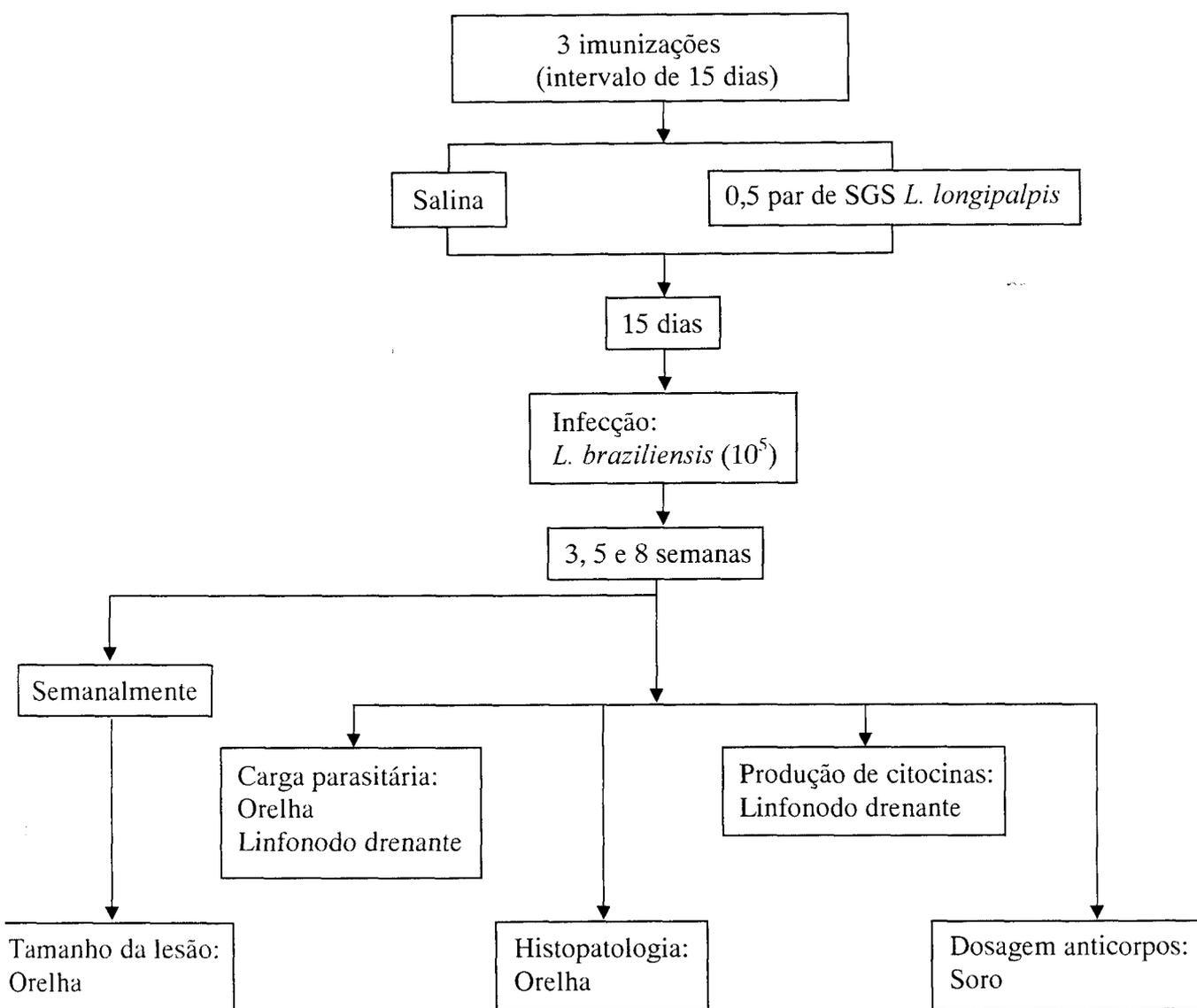
5 DESENHO EXPERIMENTAL – 2

Avaliar o curso da infecção por *L. braziliensis* em hamsters imunizados com SGS de *L. longipalpis* e infectados na presença da saliva de *L. longipalpis* ou *L. intermedia*.



6 DESENHO EXPERIMENTAL – 3

Avaliar a especificidade da resposta imune gerada pela imunização com a saliva de *L. longipalpis*.



7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 ANIMAIS

Hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) com idade entre 3 e 4 meses (TRAVI *et al.*, 2002) foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqGM, protocolado com a numeração 006/2005. Foram utilizados, em média, 8 animais por grupo.

7.2 FLEBOTOMÍNEOS E OBTENÇÃO DO SONICADO DE GLÂNDULA SALIVAR (SGS)

Os flebotomíneos utilizados foram provenientes da colônia de *L. longipalpis* do laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do CPqGM. Os insetos foram capturados na localidade de Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia. Após a captura, utilizando armadilhas luminosas, os flebotomíneos foram levados para o insetário. Hamsters anestesiados foram utilizados como fonte de alimento para os flebótomos capturados. Após a alimentação sanguínea, as fêmeas foram transferidas para os potes de ovipostura. As fêmeas mortas após a ovipostura foram retiradas e montadas em bálsamo para posterior identificação da espécie. As larvas, após a eclosão, foram alimentadas com ração à base de fezes de coelho. Após as ecdises e a transformação em adultos, os insetos foram transferidos para uma gaiola e mantidos à base de alimentação açucarada até o momento da obtenção das glândulas salivares. Estas foram retiradas dos flebotomíneos com idade entre 5 e 7 dias após sua transformação em insetos adultos. As glândulas extraídas foram colocadas em tubos de 1,5mL contendo salina fosfatada (PBS), pH 7,4 na proporção de 1 μ L para cada par, e mantidas a -70°C até o momento do uso. Para sua utilização, as glândulas foram sonicadas (20x) por 40 segundos à frequência de 1Hertz e potência de 90Watts (Branson Sonifier, Danbury, CT, USA). Em seguida, as glândulas sonicadas foram centrifugadas (10000rpm por 4 minutos) com o objetivo de obter uma fração solúvel da saliva separada dos tecidos da glândula.

7.3 IMUNIZAÇÃO E DESAFIO

Os hamsters foram imunizados por via intradérmica na orelha esquerda com 0,5 par de glândula salivar (SGS) de *L. longipalpis* em 20µL de salina, utilizando agulha de 29G (BD Ultra-Fine, NJ, USA). O mesmo volume de solução salina foi inoculado nos animais controles. Cada grupo foi vacinado três vezes com um intervalo de quinze dias entre as imunizações. Quinze dias após a última imunização, os animais foram desafiados com 0,5 par de SGS de *L. longipalpis* ou 1 par de SGS *L. intermedia* (com o objetivo de obter equivalência protéica entre as diferentes salivas) na orelha direita para avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra o SGS. Os animais foram sacrificados e suas orelhas desafiadas removidas 48 horas após a injeção de SGS para análise histológica do DTH. O sangue dos animais foi obtido para separação do soro por centrifugação e posterior avaliação da produção de anticorpos contra a saliva por ELISA. Foram utilizados 10 animais em cada grupo. Esta metodologia de imunização foi repetida e os animais foram posteriormente desafiados com *L. braziliensis* (10^5) na presença ou não da saliva de *L. longipalpis* (0,5 par por animal) ou *L. intermedia* (1 par por animal). Os diferentes valores de SGS foram utilizados para obtenção de equidade nos conteúdos protéicos.

7.4 PARASITAS E INFECÇÃO

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em meio Schneider's suplementado com soro fetal bovino (SBF) a 20%, L-glutamine a 2mM, penicilina 100U/mL e estreptomicina 100U/mL. Para infecção, os parasitas foram utilizados na fase estacionária (de 6 a 7 dias de cultura) que foi avaliada por contagens diárias. Os parasitas foram lavados três vezes em salina e ressuspensos na concentração de 1×10^8 /mL. Os hamsters foram desafiados na orelha direita com 1×10^5 (DE MOURA *et al.*, 2005) promastigotas de *L. braziliensis* na presença ou não da saliva de *L. longipalpis* ou *L. intermedia* utilizando seringas com agulhas de 30G em volume de 20µL por animal. Os animais foram sacrificados com 3, 5 e 8 semanas após a infecção. A orelha e o linfonodo drenante foram retirados para avaliação da carga parasitária. As células do linfonodo também foram utilizadas para obtenção de RNA para avaliar a produção de citocinas. A

análise histopatológica das lesões foi realizada após fixação as orelhas removidas em solução de Formol a 10%. O sangue destes animais foi coletado para separação do soro e posterior avaliação dos anticorpos circulantes.

7.5 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

A carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante foi quantificada pela técnica de diluição limitante como descrita previamente (LIMA *et al.* 1997) e a quantificação parasitária foi obtida pelo programa ELIDA (LIMA *et al.*, 1997). Após o sacrifício dos animais, a orelha e o linfonodo drenante foram removidos, homogeneizados em placa de Petri com peneira ultrafina e homogeinizador, respectivamente, com 1mL de meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, USA). Foi adicionado 4mL de meio completo (suplementado com 100U de penicilina/mL, 100µg/mL de estreptomicina, 10% de SBF) ao macerado da orelha que foi mantido em banho de gelo por cinco minutos para decantação. Ao macerado do linfonodo drenante foi adicionado 2mL de solução salina para lavagem das células (1500rpm por 10 minutos a 4°C), que, em seguida, foram resuspensas em 1mL de meio completo para contagem. Estas soluções foram diluídas seriadamente com diluição inicial de 1:5 até 1:1000 em meio completo em placas de 96 poços contendo meio semi-sólido NNN Agar-sangue (TITUS *et al.*, 1985). Foram feitas seis réplicas para cada diluição e as placas foram analisadas em microscópio invertido para a verificação do aparecimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* no sétimo dia de cultura. Durante este período, as placas foram incubadas em estufa a 25°C.

7.6 DOSAGEM DE IgG TOTAL ANTI-*Leishmania*

As placas foram sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno solúvel de *Leishmania* durante a noite a 4°C. Após três lavagens com PBS Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0,05% mais 3% de BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens, os soros diluídos (1/50) foram adicionados e a placa foi incubada durante a noite a 4°C. Em seguida, após três lavagens, o segundo anticorpo conjugado a enzima fosfatase alcalina (anti-IgG total de hamster) foi adicionado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) numa diluição de 1/1000 e a placa foi incubada durante 1 hora a 37°C. A revelação da reação foi feita utilizando o substrato paranitrofenilfosfato, diluído numa concentração de 1mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). A leitura da placa foi feita em 405nm.

7.7 DOSAGEM DE IgG TOTAL ANTI-SALIVA

As placas foram sensibilizadas com solução preparada com 1par de SGS de *L. longipalpis*/mL durante a noite a 4°C. Após três lavagens com PBS Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas com PBS Tween 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens, os soros diluídos (1/50) foram adicionados e a placa foi incubada durante a noite a 4°C. Em seguida, após três lavagens, o segundo anticorpo conjugado a enzima fosfatase alcalina (anti-IgG total de hamster) foi adicionado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) numa diluição de 1/1000 e a placa foi incubada durante 1 hora a 37°C. A revelação da reação foi feita utilizando o substrato paranitrofenilfosfato, diluído numa concentração de 1mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA). A leitura da placa foi feita em 405nm.

7.8 EXTRAÇÃO DE RNA E PREPARO DO cDNA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

O RNA total foi extraído do linfonodo drenante à infecção dos hamsters utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a contagem das células do linfonodo, estas foram separadas para carga parasitaria e as demais foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram ressuspensas em 300µL de Trizol para liberação do RNA. O RNA foi isolado e precipitado na presença de clorofórmio e isopropanol. Após lavagem com etanol a 70% e a 100%, o RNA foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato. A concentração e purificação foram determinadas após a leitura em espectrofotômetro utilizando comprimentos de ondas de A₂₆₀ e A₂₈₀. Após a quantificação, o material foi mantido a -70°C. A síntese de cDNA foi realizada acrescentando-se 2µg de RNA a 30µL de uma mistura contendo oligonucleotídeos (dt) 12-18, 2,5 µM, dNTPs, 1mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), tampão 1X (Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2mM), 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. Em seguida as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

7.9 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL

Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pela 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 ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ = 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 pela equação de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência}$, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$.

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 mantêm 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 é observado apenas 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.

Na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão gênica infere-se 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 $E = 10^{(-1/slope)}$, 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.

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

Primers	Identificação Gene Bank	Seqüência	Tm amplicon (°C)	Tamanho amplicon (pb)
GAPDH	X02231	5'CTGACATGCCGCCCTGGAG 3'TCAGTGTAGCCCAGGATGCC	82	101
IFN- γ	M28621	5'GAAGCTCACCAAGATTCCGGTAA 3'TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT	78	91
IL-10	AF046210	5'AGACGCCTTCTCTTGGAGCTTAT 3'GGCAACTGCAGCGCTGTC	77	102
TGF- β	AF046214	5'GCTACCACGCCAACTTCTGTC 3'TGTTGGTAGAGGGCAAGG	57.3	21

7.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As orelhas dos hamsters foram retiradas e fixadas em solução formol a 10%. Após serem processadas e hidratadas, estas foram embebidas em parafina e cortadas (5 μ m) em micrótomo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica, com o perfil celular como parâmetro de avaliação.

7.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, USA). A comparação entre os grupos imunizados e não imunizados foi realizada através do teste não-paramétrico Mann-Whitney. Naquelas condições em que foram avaliadas as áreas sob as curvas, estes valores foram calculados de acordo com a fórmula $\Delta X (Y1+Y2)/2$ e posteriormente os imunizados foram comparados com os não-imunizados pelo mesmo teste estatístico.

8 RESULTADOS

8.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA

Dados da literatura têm demonstrado que a reação de hipersensibilidade induzida por proteínas salivares pode ser uma indicação de proteção contra um posterior desafio constituído de parasita na presença da saliva (VALENZUELA *et al*, 2001; GOMES *et al*, 2002). Para avaliar a possibilidade de proteção cruzada entre salivas de diferentes vetores, o desenvolvimento da Resposta de Hipersensibilidade Tardia (DTH) foi analisado. Os hamsters foram imunizados com SGS equivalente a 0,5 pares de *L. longipalpis* por três vezes com intervalo de 15 dias e os animais controles foram injetados da mesma forma com solução salina. Quinze dias após a última imunização, os animais foram desafiados com SGS equivalente a 0,5 pares de *L. longipalpis* ou 1 par de SGS de *L. intermedia*, com o objetivo de adquirir equivalência protéica entre as salivas de *L. longipalpis* e *L. intermedia*. Quarenta e oito horas após o desafio, os animais foram sacrificados, as orelhas nas quais foram realizados os desafios foram removidas e submetidas à análise histopatológica. Como mostrado na Figura 1, ocorreu uma forte reação de DTH induzida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* (Fig.1). A região da orelha desafiada apresenta um intenso infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares (B-E). A reação apresenta maior intensidade quando o desafio também é feito com a saliva do mesmo vetor, sugerindo especificidade na reação (B-C), embora, os animais desafiados com SGS de *L. intermedia* também desenvolvam DTH (E-F). A análise histológica das orelhas dos animais desafiados com SGS de *L. intermedia* demonstra uma maior frequência de células com morfologia compatível a de mastócitos (F), que não foi observada nos animais desafiados com SGS de *L. longipalpis*.

Desafio

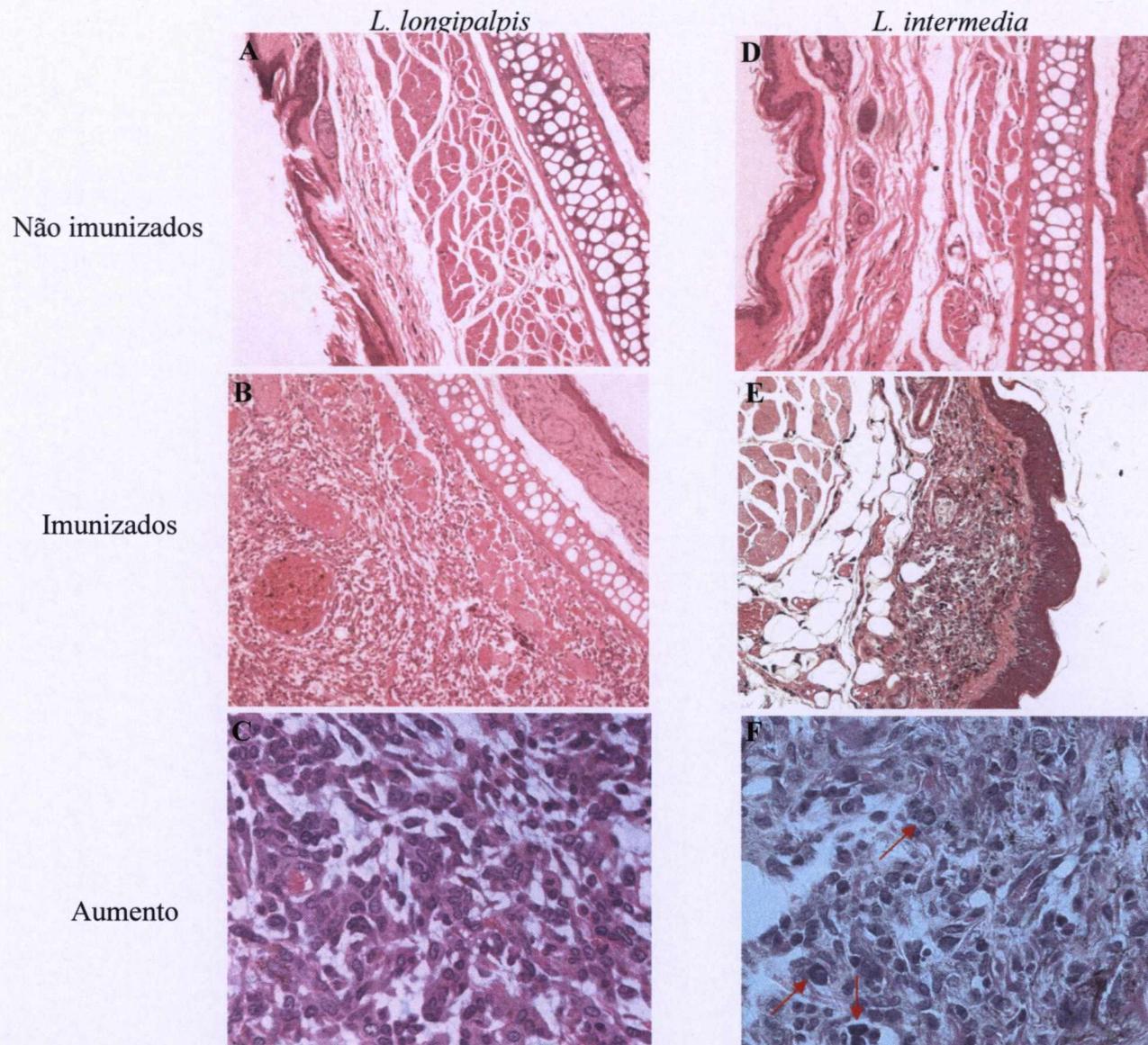


Figura 1 Avaliação do DTH em cortes histológicos das orelhas de hamster. Os animais foram imunizados ou não por 3 vezes com SGS de *L. longipalpis* equivalente à 0,5 pares por via intradérmica na orelha com intervalo de 15 dias. O desafio foi realizado 15 dias após a última imunização na orelha contralateral com SGS de *L. longipalpis* (0,5 pares) ou de *L. intermedia* (1 par). Animais não-imunizados (A e D, em aumento de 100x), imunizados e desafiados com SGS de *L. longipalpis* (B e C, aumentado 100x) ou de *L. intermedia* (E e F, aumentado 400x). Fotos representativas de 6 animais/grupo. Setas indicando presença de mastócitos.

8.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SALIVA

Verificou-se a produção de anticorpos produzidos em resposta à imunização pelo método de ELISA. Os resultados obtidos a partir da leitura da densidade ótica mostram que os animais imunizados com SGS produzem cerca de oito vezes mais anticorpos em relação aos animais controles injetados com solução salina (Fig. 2). Estes dados confirmam o potencial imunogênico das proteínas salivares de *L. longipalpis*, cuja utilização pode favorecer o hospedeiro numa exposição posterior ao parasita na presença da saliva.

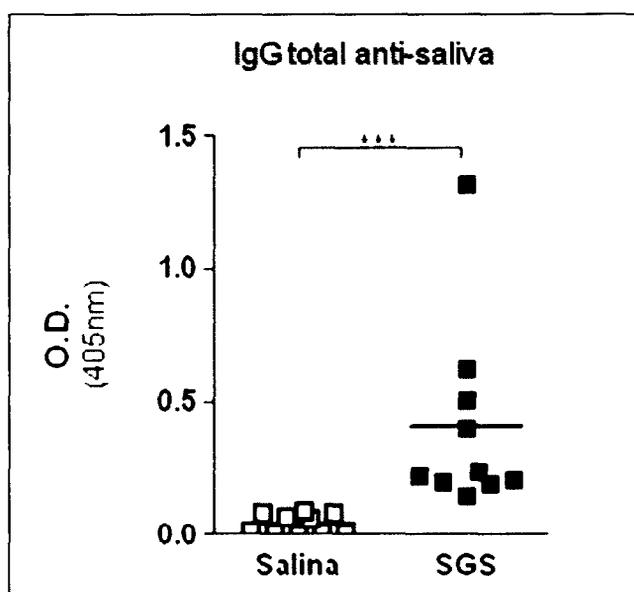


Figura 2 Produção de anticorpos séricos reagentes a saliva por ELISA em hamsters imunizados por via intradérmica três vezes na orelha com SGS de *L. longipalpis* equivalente à 0,5 pares ou tratados do mesmo modo com solução salina com intervalo de 15 dias entre cada imunização. Dosagem realizada no 15º dia após a última imunização (n=10 em cada grupo). ***p < 0,001 (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* EM HAMSTER

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da infecção causada por *L. braziliensis* em hamsters, os animais foram imunizados ou não com SGS de *L. longipalpis* na orelha esquerda e, em seguida, infectados por via intradérmica na orelha direita com 10^5 formas promastigotas, obtidas na fase estacionária da cultura, na presença da saliva de *L. longipalpis* (Fig. 3 A) ou *L. intermedia* (Fig. 3 B). A espessura da lesão foi avaliada semanalmente. O aparecimento da lesão pode ser observado logo na segunda semana pós-desafio (Fig. 3) e estes animais não apresentam cura espontânea até 12 semanas após o desafio. Estes dados demonstram o modelo de alta susceptibilidade dos hamsters a *L. braziliensis*. A imunização, entretanto, não induziu diminuição no tamanho da lesão na infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva dos diferentes vetores. Para avaliar estatisticamente se o curso da infecção havia sido alterado pela imunização, foi feito o cálculo da área sobre a curva de cada animal e, em seguida, a análise estatística através do teste t não-paramétrico Mann-Whitney, utilizando a média destes valores (Fig. 3 D). Esta análise confirma que não há diferença entre os tamanhos de lesão dos animais imunizados e dos não-imunizados, independente da saliva de vetor utilizada no desafio dos animais.

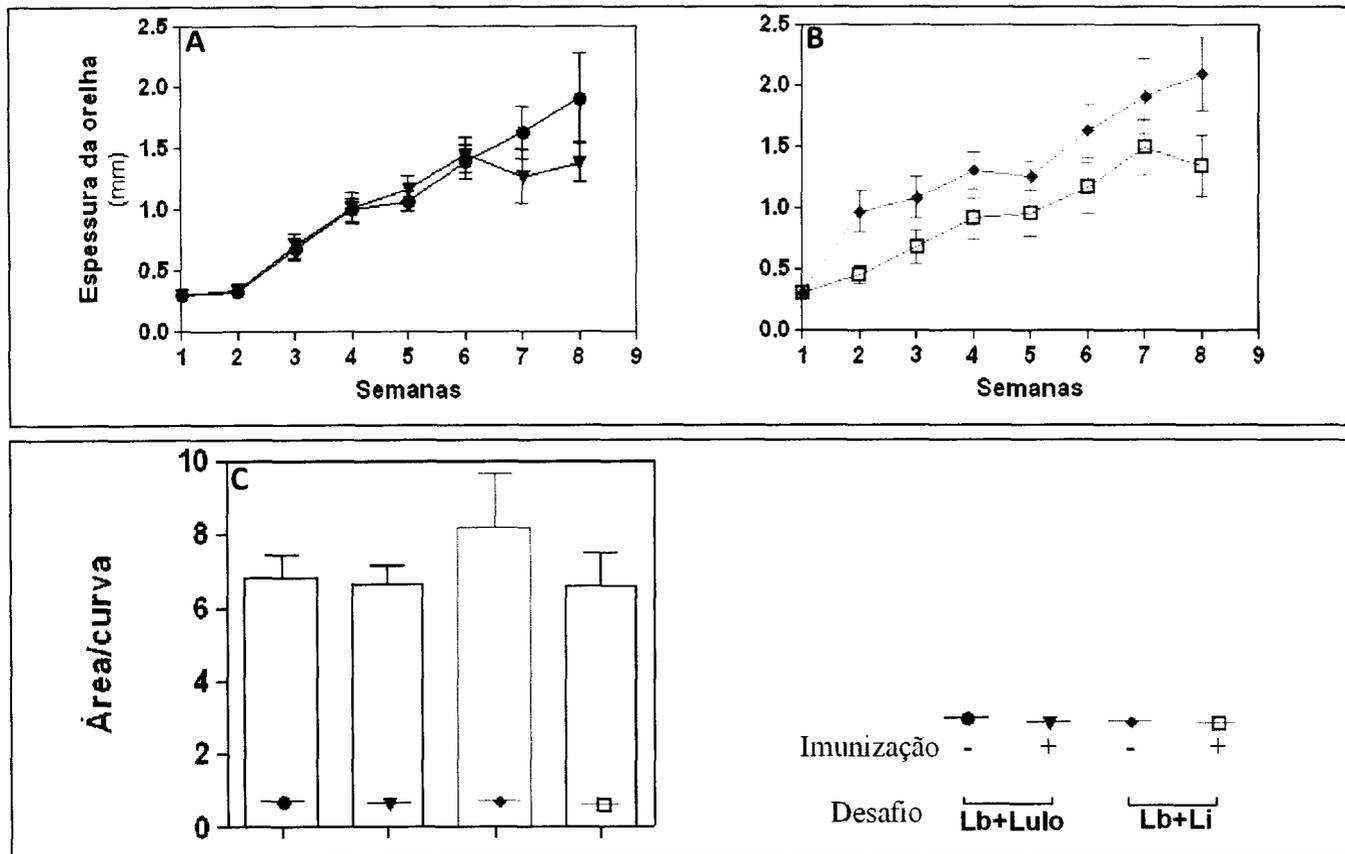


Figura 3 Desenvolvimento da lesão em hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares com intervalo de 15 dias e desafiados na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores. A: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares, tratados com salina (circulo) ou imunizados com SGS (triângulo invertido). B: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* (equivalente a 1 par), tratados com salina (losango) ou imunizados com SGS de *L. longipalpis* (quadrado vazio). C: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=11-12 animais/grupo). $p > 0,5$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.4 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A INFECÇÃO

Após avaliação da infecção em hamster, foram definidos os tempos de sacrifício destes animais. De acordo com os resultados do desenvolvimento da lesão, 3, 5 e 8 semanas pós-desafio foram os pontos de análise detalhada da resposta imune, bem como da carga parasitária dos animais.

A influência da resposta imune induzida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* no controle da infecção por *L. braziliensis* foi avaliada pela carga parasitária das orelhas desafiadas e os respectivos linfonodos drenantes. A quantificação de parasitas foi feita pelo método de diluição limitante com estimativa posterior pelo programa ELIDA.

Os resultados mostram uma redução, ao longo da infecção, na quantidade de parasitas na orelha dos animais imunizados (Fig. 4). No entanto, a análise estatística feita considerando os valores da área sobre a curva de cada animal demonstra que esta diferença é estatisticamente significativa apenas entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (Fig. 4 C). Estes dados sugerem a possibilidade de reação cruzada entre anticorpos produzidos contra a saliva de *L. longipalpis* e os antígenos salivares de *L. intermedia*.

Embora não tenha sido detectada diferença estatística entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis*, há tendência de redução na carga parasitária dos animais imunizados. Um provável fator que influenciou este resultado foi o alto desvio padrão observado neste grupo (Fig. 4 A). No entanto, esta ausência de diferença não invalida o potencial efeito protetor da imunização com a saliva de *L. longipalpis*.

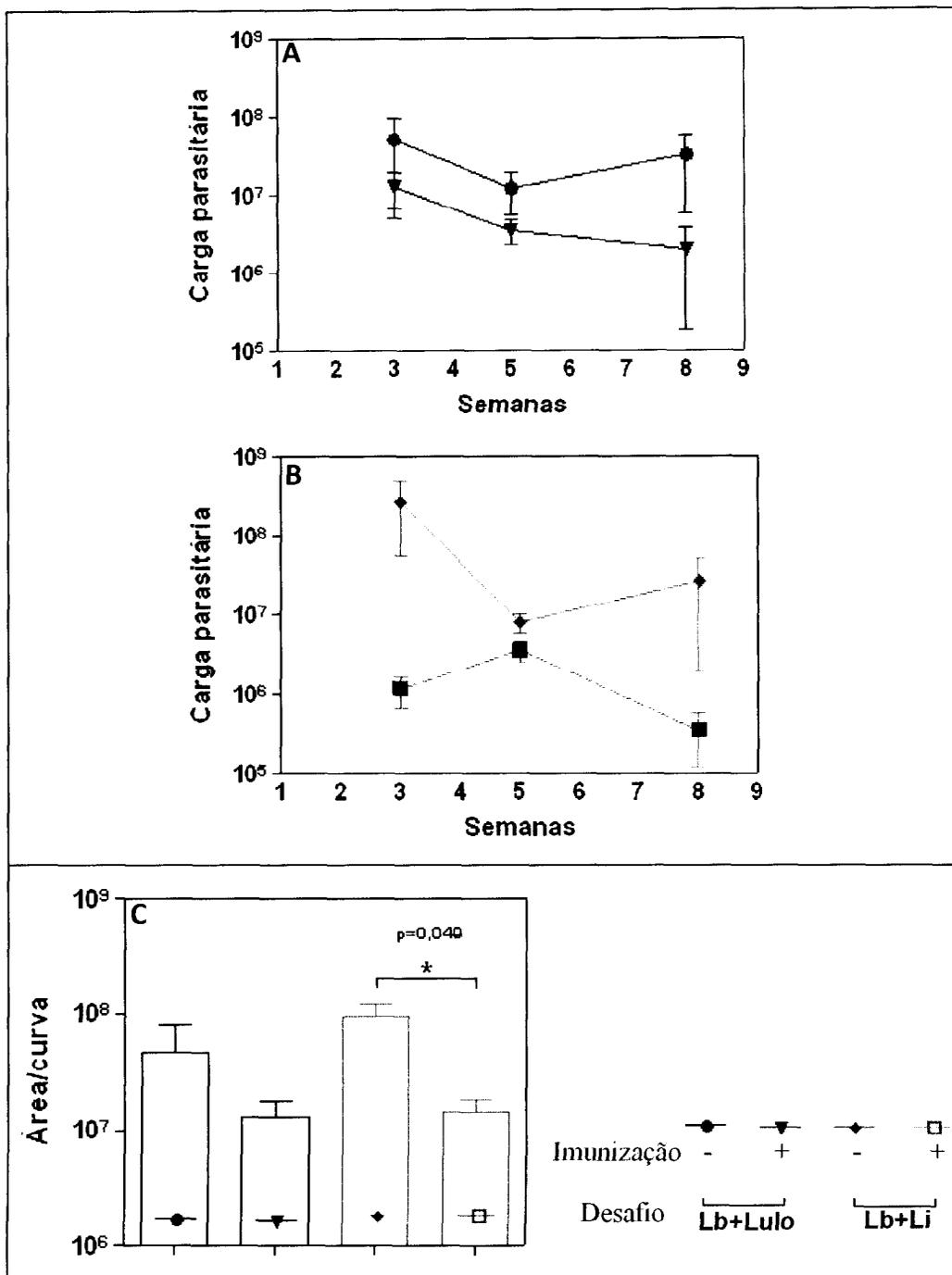


Figura 4 Avaliação da carga parasitária na orelha de hamsters imunizados ou não 3 vezes com intervalo de 15 dias com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha contralateral com 10⁵ formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores pelo método de Diluição Limitante. A: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. longipalpis*, tratados com salina (círculo) ou imunizados com SGS (triângulo invertido). B: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* equivalente a 1 par, tratados com salina (losango) ou imunizados com SGS de *L. longipalpis* (quadrado vazio). C: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=6-9 animais/grupo). * $p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

A carga parasitária no linfonodo drenante da lesão também foi avaliada ao longo da infecção (Fig. 5). Os resultados mostram que, apesar da quantidade de parasitas continuar aumentando até a oitava semana em todos os grupos, a carga parasitária dos animais imunizados é significativamente menor (Fig. 5 A e B). Entre os grupos de animais desafiados na presença da saliva de *L. logipalpis*, pode-se observar uma diferença de aproximadamente dez vezes na quantidade de parasitas nos linfonodos drenantes na terceira semana pós-infecção entre os animais imunizados e não imunizados. Esta diferença é mantida na quinta semana e aumenta para cerca de cem vezes na oitava semana (Fig. 5 A). Entretanto, nos animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia*, observa-se uma cinética diferente na persistência da *L. braziliensis* nos linfonodos drenantes destes animais (Fig. 5 B). Inicialmente, não há diferença na quantidade de parasitas na terceira semana após a infecção. No entanto, na quinta semana, estes valores aumentam cerca de cem vezes nos animais não imunizados, enquanto se mantém praticamente inalterados nos animais imunizados. A diferença entre os grupos se mantém em cerca de dez vezes na oitava semana (Fig. 5 B).

A análise estatística feita através da comparação entre a área sobre a curva de cada animal mostra que esta redução é estatisticamente significante (Fig. 5 C). Estes dados confirmam o potencial protetor contra a infecção por *L. braziliensis* conferido pela imunização com SGS de *L. logipalpis*.

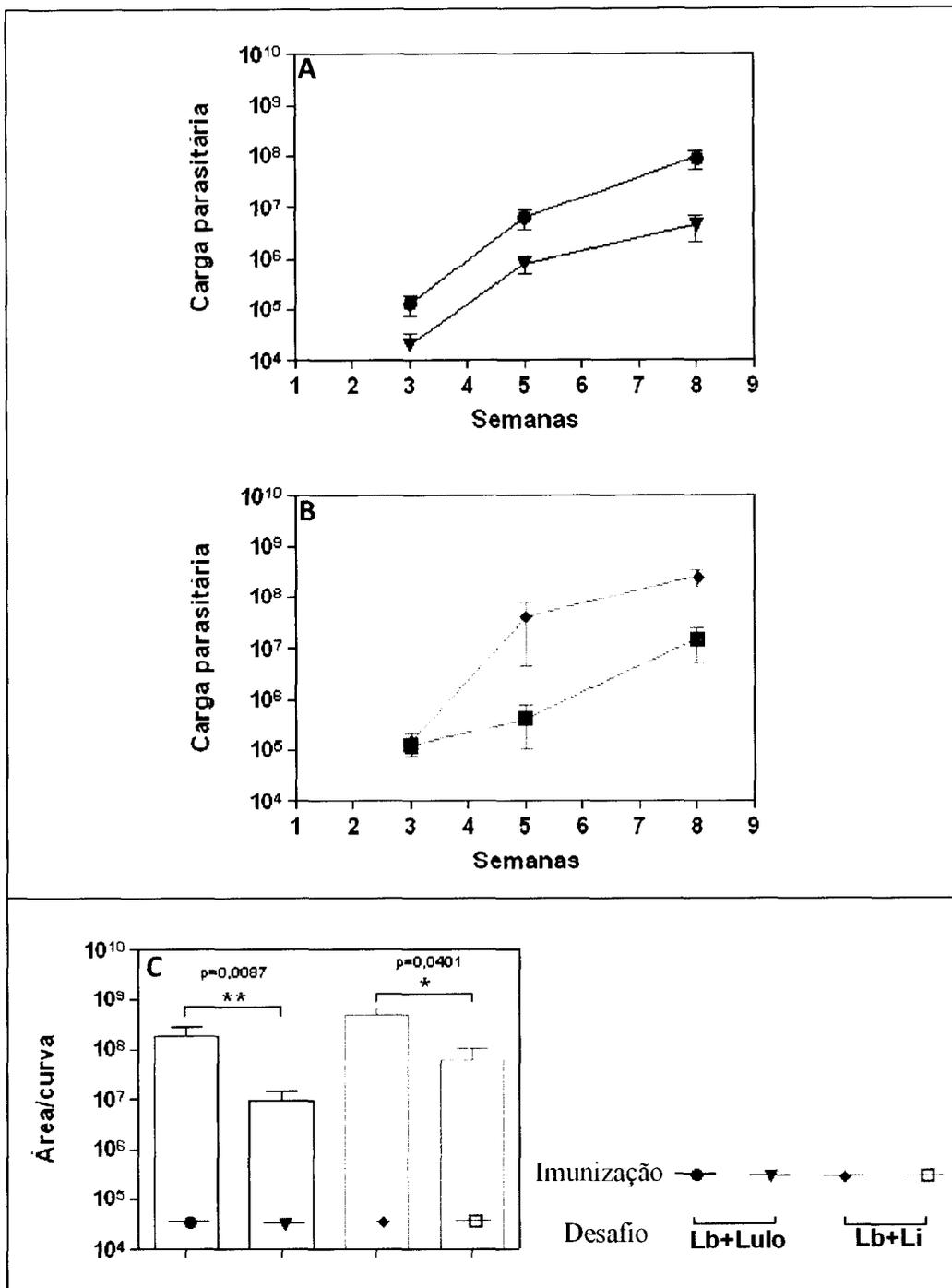


Figura 5 Avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante de hamsters imunizados ou não 3 vezes com intervalo de 15 dias com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha contralateral com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores pelo método de Diluição Limitante. A: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. longipalpis*, tratados com salina (círculo) ou imunizados com SGS (triângulo invertido). B: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* equivalente a 1 par, tratados com salina (losango) ou imunizados com SGS de *L. longipalpis* (quadrado vazio). C: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=8-10 animais/grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (teste não-paramétrico Mann Whitney).

8.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SALIVA DURANTE A INFECÇÃO

A produção de anticorpos anti-saliva foi avaliada por ELISA nos pontos de análise ao longo da infecção. Após o sacrifício dos animais, o soro foi coletado. Os resultados mostram que os animais imunizados com SGS de *L. longipalpis* produzem anticorpos contra a saliva até 5 semanas após o último reforço recebido no momento do desafio (Fig. 6 A). A concentração de anticorpos demonstrada pelos valores da densidade óptica é bem maior nos animais imunizados e desafiados na presença da mesma saliva, o que não é observado nos animais desafiados na presença do SGS de *L. intermedia* (Fig. 6 B). Estes dados sugerem especificidade na reação. No entanto, os animais imunizados e desafiados com *L. braziliensis* e saliva de *L. intermedia* produzem anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis* até a quinta semana após o desafio, sugerindo a possibilidade de reação cruzada entre as diferentes salivas.

A avaliação estatística destes dados mostra que o aumento nas concentrações de anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis* nos animais dos grupos imunizados é significativo, como demonstrado pela densidade óptica, independente do desafio que estes animais receberam (Fig. 6 C).

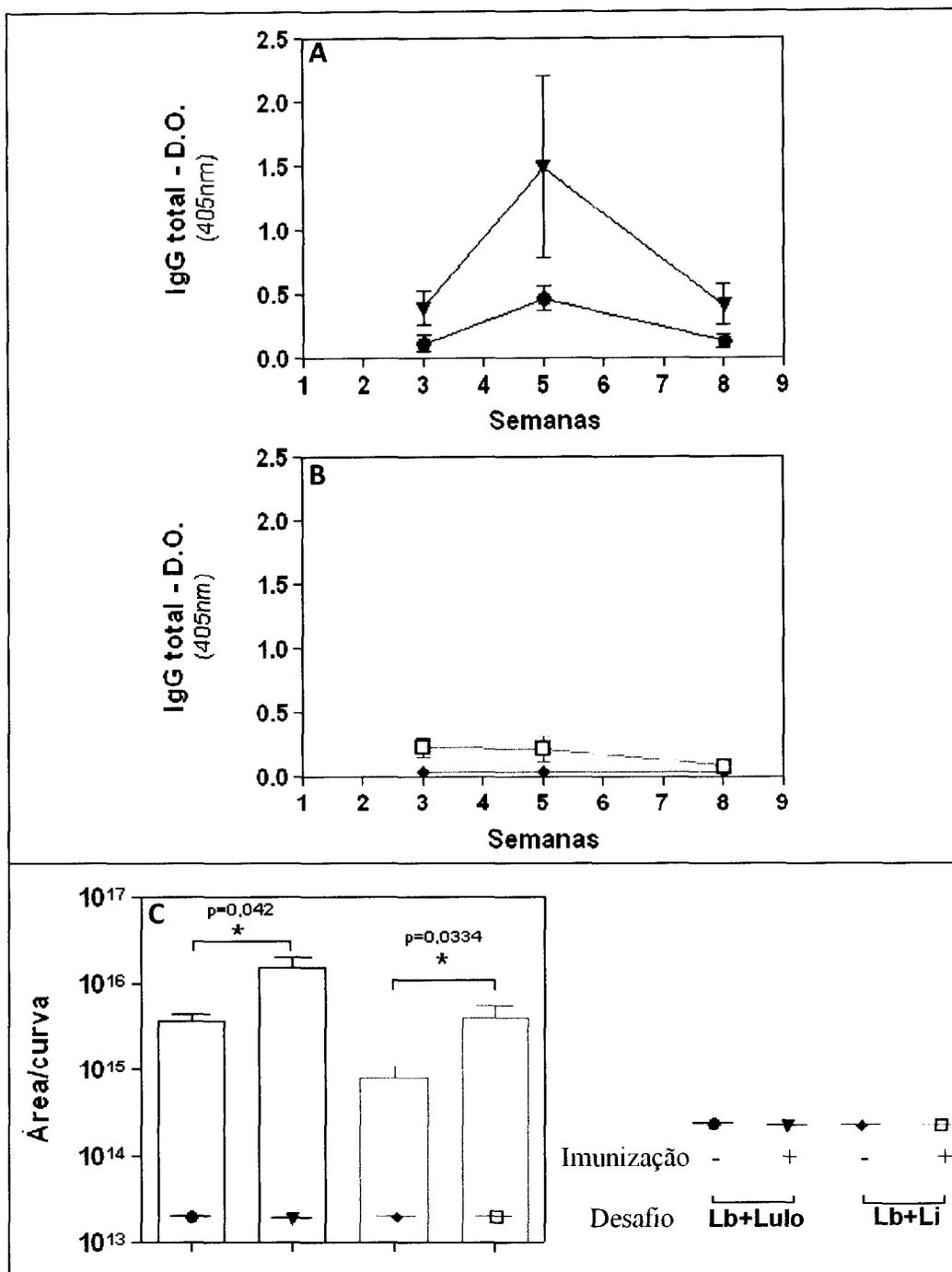


Figura 6 Produção de anticorpos específicos contra saliva de *L. longipalpis* no soro de hamsters imunizados ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores avaliada por ELISA. A: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. longipalpis*, tratados com salina (círculo) ou imunizados com SGS (triângulo invertido). B: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* equivalente a 1 par, tratados com salina (losango) ou imunizados com SGS de *L. longipalpis* (quadrado vazio). C: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=11-12 animais/grupo). * $p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* DURANTE A INFECÇÃO

Utilizando as mesmas amostras de soro, foi avaliada também a produção de anticorpos contra *Leishmania* durante a infecção (Fig. 7).

Comparando os dados dos animais imunizados entre si, independente do desafio que receberam, observa-se que a cinética da produção, bem como a concentração, de anticorpos contra a *Leishmania* é muito similar (Fig. 7 A e B). Da mesma forma, há uma grande similaridade na cinética e na concentração de anticorpos produzidos pelos animais não imunizados, quando comparados entre si. No entanto, fazendo uma comparação entre os grupos desafiados na presença da mesma saliva, os animais imunizados produzem menos anticorpos contra a *Leishmania* ao longo de toda infecção (Fig. 7). As concentrações de anticorpos nos animais não imunizados são, em média, o dobro daquelas dos animais imunizados, independente do desafio que receberam (Fig. 7 A e B). Estas análises evidenciam o potencial protetor conferido pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* contra a *Leishmania*, independente da saliva presente no momento do desafio por conta da sua alta imunogenicidade.

Da mesma forma, foi feita a avaliação estatística destes dados pela comparação entre os valores das áreas sobre as curvas de cada animal dos grupos imunizados e não imunizados. Esta análise mostra que a redução na produção de anticorpos pelos animais imunizados é estatisticamente significativa quando comparada com os não imunizados (Fig. 7 C).

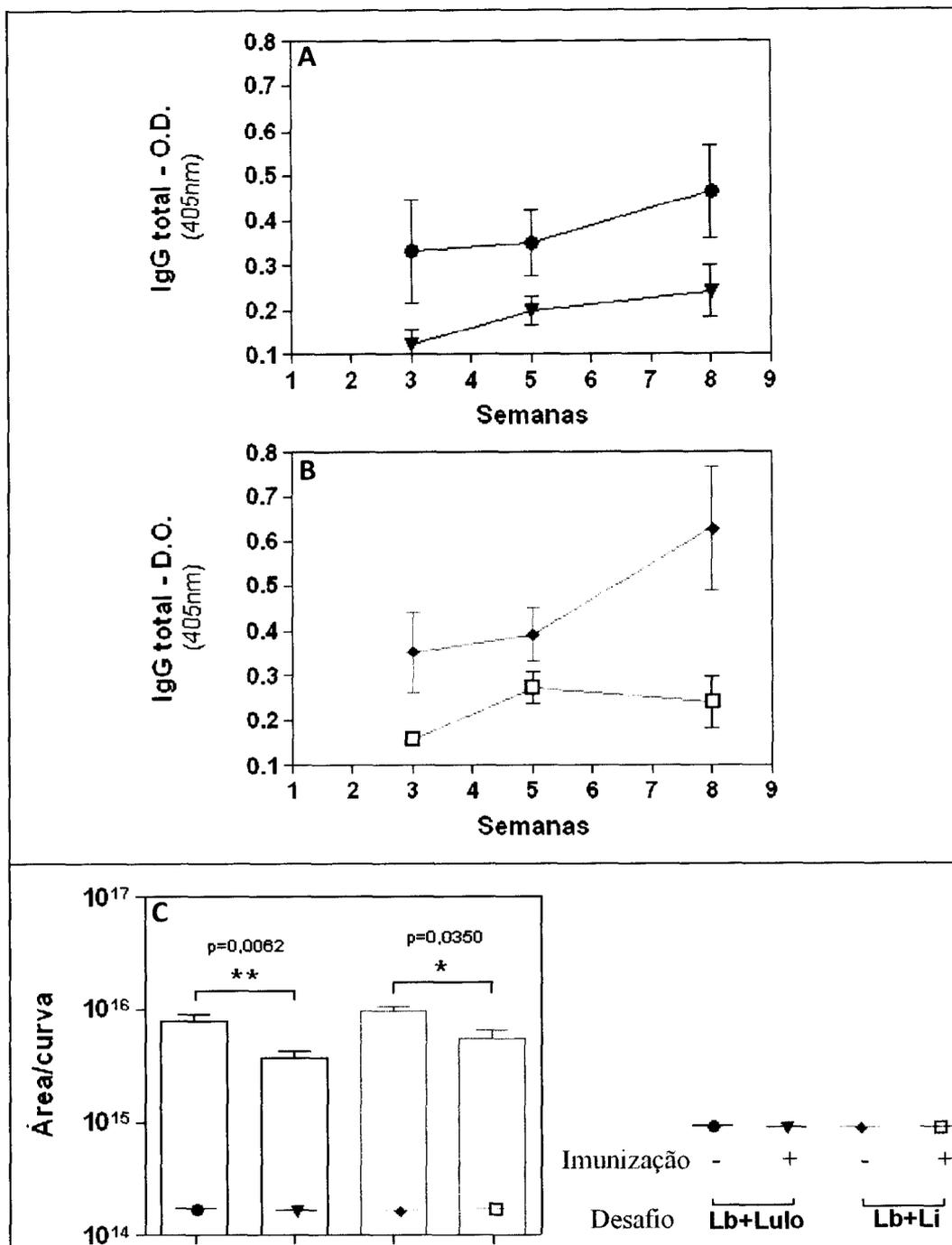


Figura 7 Produção de anticorpos específicos contra *Leishmania* no soro de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores avaliada por ELISA. A: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. longipalpis*, tratados com salina (círculo) ou imunizados com SGS (triângulo invertido). B: Animais desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* equivalente a 1 par, tratados com salina (losango) ou imunizados com SGS de *L. longipalpis* (quadrado vazio). C: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=11-12 animais/grupo). **p < 0,01 e *p < 0,05 (teste não paramétrico Mann-Whitney).

8.7 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO LINFONODO DRENANTE

Na tentativa de identificar o padrão da resposta imune dos hamsters, a produção de citocinas foi avaliada por PCR em tempo real nas células extraídas do linfonodo drenante ao longo da infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de diferentes vetores (Fig. 8 – 10).

Dentre as citocinas avaliadas, o IFN- γ teve os níveis de expressão mais elevados (Fig. 8). Desde a terceira semana, a média de expressão entre todos os grupos foi cerca de vinte vezes (Fig. 8 A), com pico de expressão em cerca de quarenta vezes na quinta semana (Fig. 8 B). Na oitava semana, os níveis de expressão reduziram para níveis similares aos da terceira semana (Fig. 8 A e C). Apesar da tendência de aumento na expressão de IFN- γ nos animais imunizados, as cinéticas de expressão, bem como as quantidades relativas, foram similares entre os grupos imunizados, não imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis*. Dessa forma, a análise estatística entre estes não revelou diferença significativa nos pontos analisados ao longo da infecção. No entanto, os níveis de expressão de IFN- γ pelos animais imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* são estatisticamente maiores, na terceira semana, do que aqueles não imunizados (Fig. 8 A). Em momentos mais tardios da infecção, esta tendência é mantida, embora não haja diferença significante entre os grupos imunizados e não imunizados (Fig. 8 B e C).

Estes resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos envolvidos na proteção parcial contra *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* em hamsters é mediado por esse aumento inicial nos níveis de expressão de IFN- γ . Além disso, a resposta inespecífica gerada pela imunização, uma vez que o mesmo não foi observado nos grupos de animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis*.

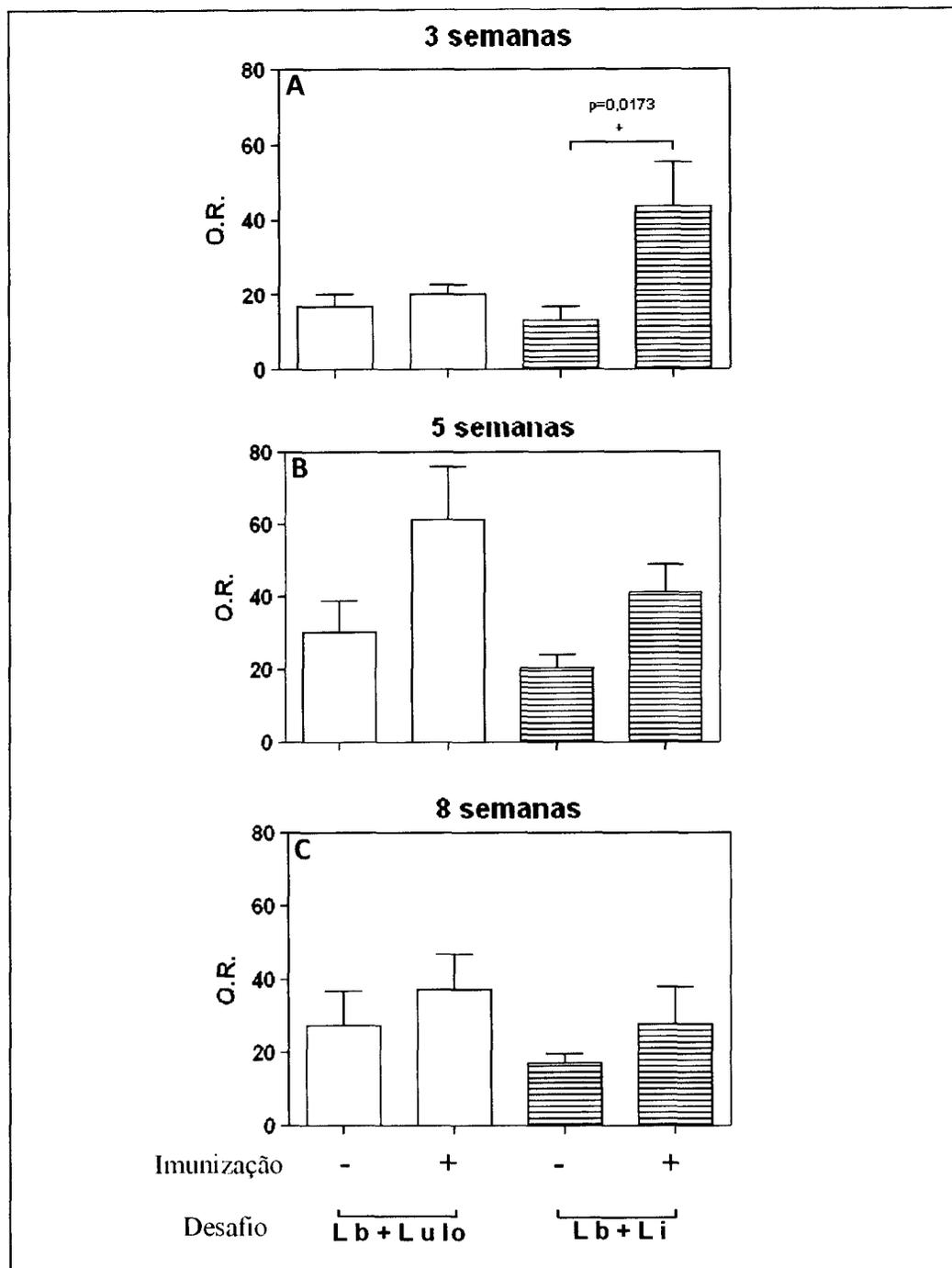


Figura 8 Avaliação dos níveis de expressão de IFN- γ por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores. Animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* (barras brancas) imunizados (+) ou não (-). Animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (barras listradas) imunizados (+) ou não (-). A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. (n=8-10 animais/grupo). *p<0,05 (teste não paramétrico Mann-Whitney).

Também os níveis de expressão de IL-10 foram avaliados através da mesma metodologia (Fig. 9).

Os resultados mostram que a quantidade relativa de expressão de IL-10 é baixa na terceira semana, porém estatisticamente diferente entre os animais imunizados, não imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* (Fig. 9 A). Os primeiros expressam níveis significativamente menores desta citocina, enquanto não há diferença estatística entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* neste ponto (Fig. 9 A). Estes valores se mantêm praticamente inalterados até a quinta semana, apesar de não haver diferença estatística entre os animais imunizados, não imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* (Fig. 9 B). Neste ponto, entretanto, há diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados, não imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. intermedia*, onde os primeiros expressam níveis menores de IL-10 (Fig. 9 B). Na oitava semana pós-infecção, a diferença estatística entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* volta a aparecer por conta do aumento na expressão de IL-10 pelos animais não imunizados, enquanto não há diferença entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (Fig. 9 C).

Os níveis de expressão de IL-10 observados sugerem que esta via tem um papel importante na proteção parcial contra a infecção por *L. braziliensis*. Porém, as cinéticas observadas entre os grupos desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* ou *L. intermedia*, sugerem que esta via parece atuar em momentos diferentes da infecção.

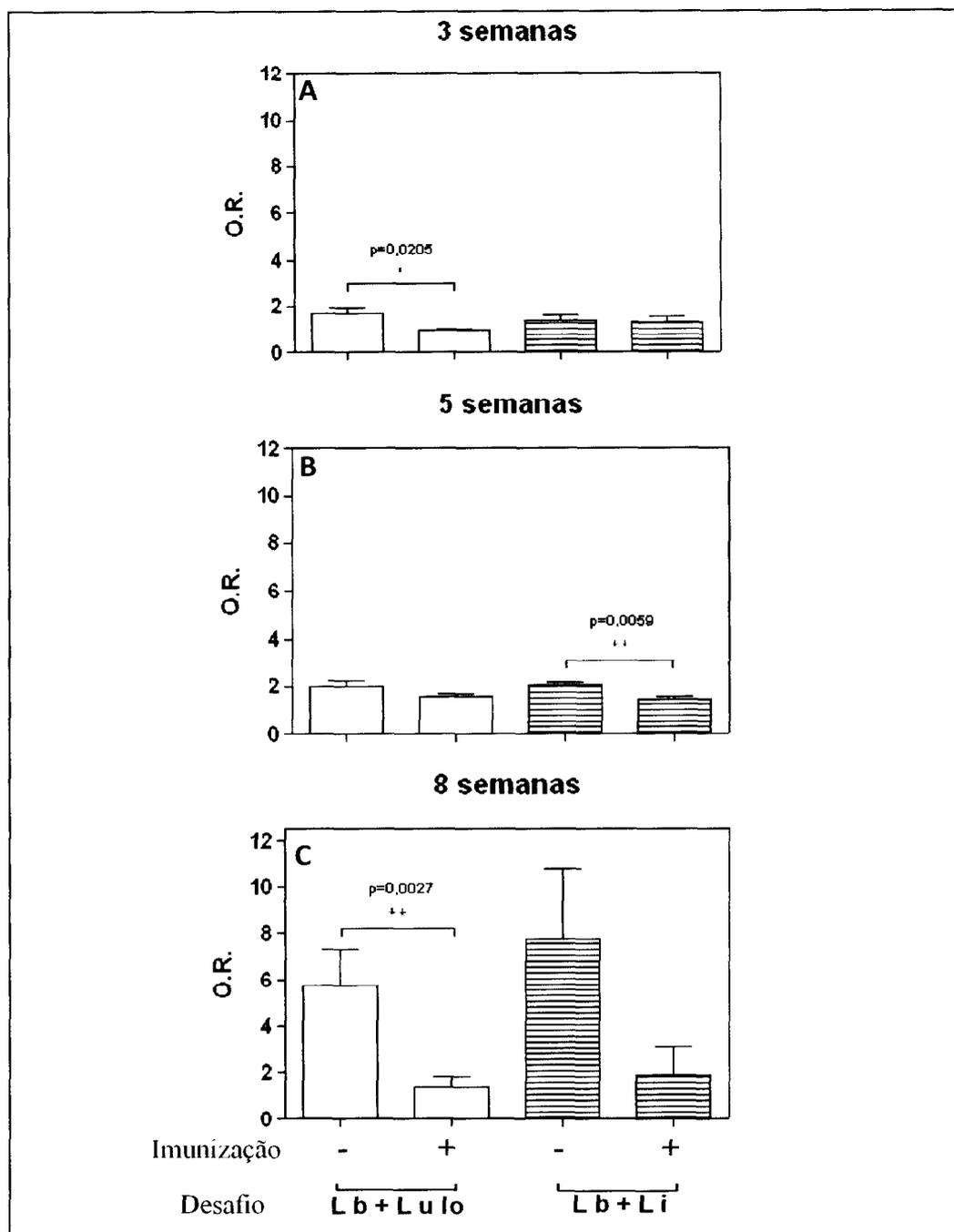


Figura 9 Avaliação dos níveis de expressão de IL-10 por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores. Animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* (barras brancas) imunizados (+) ou não (-). Animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (barras listradas) imunizados (+) ou não (-). A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. (n=6-10 animais/grupo). ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ (teste não paramétrico Mann-Whitney).

Da mesma forma, foram avaliados os níveis de expressão de TGF- β no linfonodo drenante dos hamsters.

Os valores das quantificações relativas mostram que houve pouca alteração nos níveis de expressão desta citocina entre os animais submetidos à experimentação e os normais *naive* (Fig. 10). Porém existe diferença nas quantidades de expressão TGF- β entre os animais imunizados e não imunizados.

Desde a terceira semana após a infecção os níveis de expressão do TGF- β são estatisticamente menores nos animais imunizados (cerca da metade dos valores expressos pelos animais não imunizados), independente da saliva presente no momento do desafio (Fig. 10 A). Estes valores se mantêm praticamente inalterados até a quinta semana pós-infecção, onde, também, os animais não imunizados e desafiados tanto na presença da saliva de *L. longipalpis*, de *L. intermedia*, expressam níveis estatisticamente maiores desta citocina (Fig. 10 B).

No entanto, na oitava semana após a infecção, os níveis de expressão do TGF- β caem ligeiramente nos grupos de animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis*, imunizados ou não (Fig. 10 C). Neste ponto, portanto, não é observada diferença estatística entre estes grupos, porém a tendência de redução na expressão desta citocina pelos animais imunizados é mantida.

Em contrapartida, os animais não imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* têm seus níveis de expressão do TGF- β aumentados na oitava semana, enquanto aqueles animais imunizados apresentam redução (Fig. 10 C). Dessa forma, a diferença estatística é mantida entre os grupos imunizados e não imunizados, desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* neste ponto.

Estes dados sugerem que o papel do TGF- β atua de modo similar entre os animais desafiados na presença de diferentes salivas na proteção parcial contra a infecção por *L. braziliensis*.

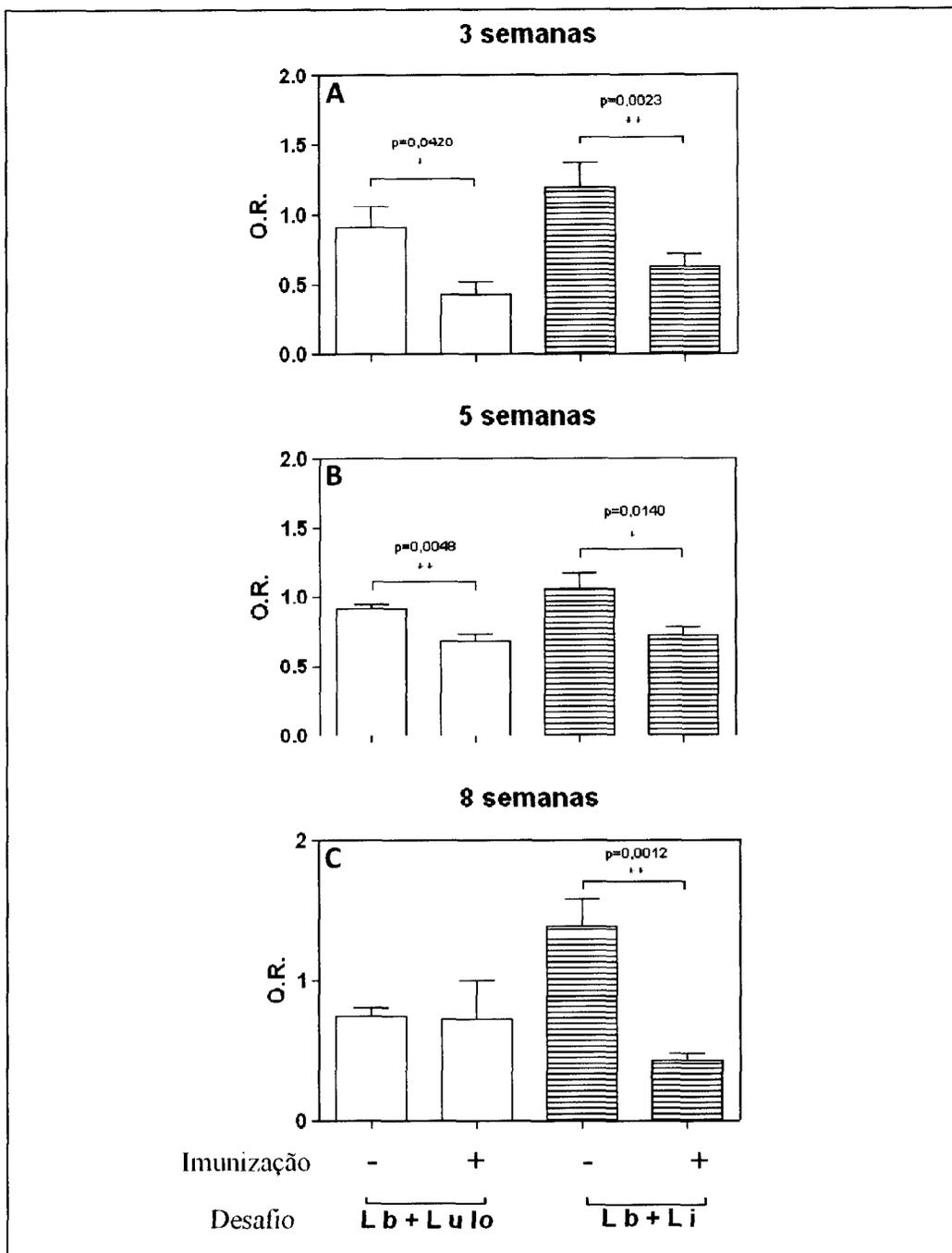


Figura 10 Avaliação dos níveis de expressão de TGF- β por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados por via intradérmica na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral na presença saliva de diferentes vetores. Animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis* (barras brancas) imunizados (+) ou não (-). Animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (barras listradas) imunizados (+) ou não (-). A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. (n=7-10 animais/grupo). ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ (teste não paramétrico Mann-Whitney).

8.8 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* EM HAMSTER

Com objetivo de avaliar a especificidade da reação entre a imunização com a saliva de *L. longipalpis* e a saliva utilizada no desafio, os experimentos foram repetidos utilizando apenas *L. braziliensis* no desafio.

O desenvolvimento da infecção causada por *L. braziliensis* em hamsters foi avaliado em animais imunizados ou não com SGS de *L. longipalpis* na orelha esquerda e, em seguida, infectados por via intradérmica na orelha direita com 10^5 formas promastigotas. A espessura da lesão foi avaliada semanalmente. De modo similar aos demais grupos, o aparecimento da lesão começa a ser percebido logo na segunda semana pós-desafio (Fig. 11 A) e estes animais não apresentam cura espontânea até 12 semanas após o desafio. A imunização também não induziu diminuição no tamanho da lesão na infecção por *L. braziliensis*.

A análise estatística destes dados também foi feita pela comparação entre as áreas sobre as curvas dos animais. Os resultados confirmam que não há diferença significativa entre os tamanhos de lesão dos animais imunizados e dos não-imunizados (Fig. 11 B).

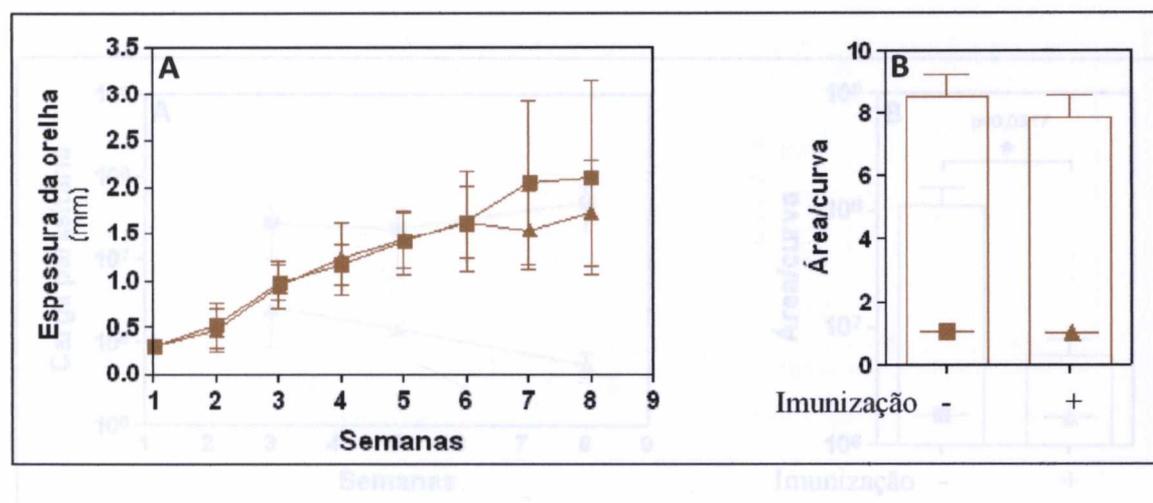


Figura 11 Desenvolvimento da lesão em hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias e desafiados na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis*. A: Animais desafiados com *L. braziliensis*, tratados com salina (quadrado) ou imunizados com SGS (triângulo). B: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=11-12 animais/grupo). $p > 0,5$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney). $*p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.9 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DURANTE A INFECÇÃO

Com o objetivo de testar a especificidade da imunização com a saliva de *L. longipalpis*, a carga parasitária dos animais desafiados somente com *L. braziliensis* foi avaliada pelo mesmo método, bem como nos mesmos pontos, dos demais grupos testados.

Os resultados mostram que desde a terceira semana há uma diferença entre os animais imunizados e os não imunizados, nos quais os primeiros apresentam redução na carga parasitária da orelha desafiada (Fig. 12 A). Esta diferença se mantém e é acentuada até a oitava semana de infecção. Dessa forma, observa-se uma redução da carga parasitária nos animais imunizados durante a infecção, enquanto há um aumento nos animais não imunizados, confirmando o potencial protetor da imunização com a saliva de *L. longipalpis*.

A análise estatística feita através da comparação entre os valores das áreas sobre as curvas de cada animal ao longo da infecção confirma que estas diferenças são significantes (Fig. 12 B). Estes resultados sugerem que a proteção conferida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* é inespecífica, uma vez que o desafio foi feito somente com *L. braziliensis*.

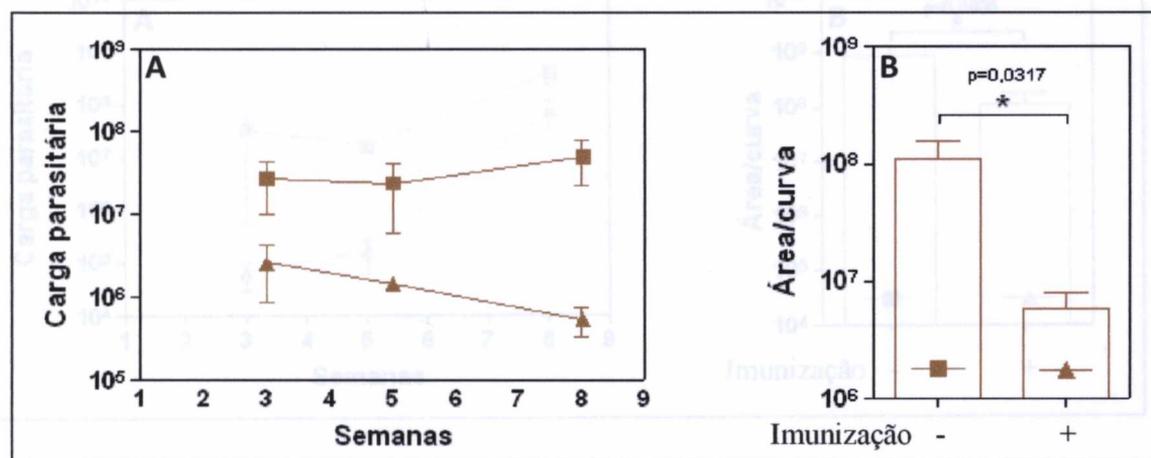


Figura 12 Avaliação da carga parasitária no lintocónto areolar de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* pelo método de Diluição Limitante. A: Animais desafiados com *L. braziliensis*, tratados com salina (quadrado) ou imunizados com SGS (triângulo). B: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=6-9 animais/grupo). * $p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

A carga parasitária também foi avaliada no linfonodo drenante da lesão na orelha pelo mesmo método.

De modo similar à carga parasitária da orelha, observa-se uma redução da carga parasitária nos linfonodos drenantes dos animais imunizados desde a terceira semana de infecção (Fig. 13 A). Estes valores permanecem praticamente os mesmos na quinta semana. No entanto, entre a quinta e a oitava semana, há um aumento na carga parasitária em ambos grupos. Este aumento é mais acentuado nos animais imunizados, o que aproxima os valores da carga parasitária, tornando similar a quantidade de parasitas dos animais imunizados e dos não imunizados (Fig. 13 A).

Novamente, a avaliação estatística das áreas sobre as curvas destes dados revelou que estas diferenças observadas durante a infecção são significativas (Fig. 13 B). Mais uma vez, estes resultados sugerem que a proteção conferida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* é independente da presença desta no momento do desafio. Esta resposta seria, portanto, uma reação inespecífica gerada contra a saliva que favorece o controle do parasita.

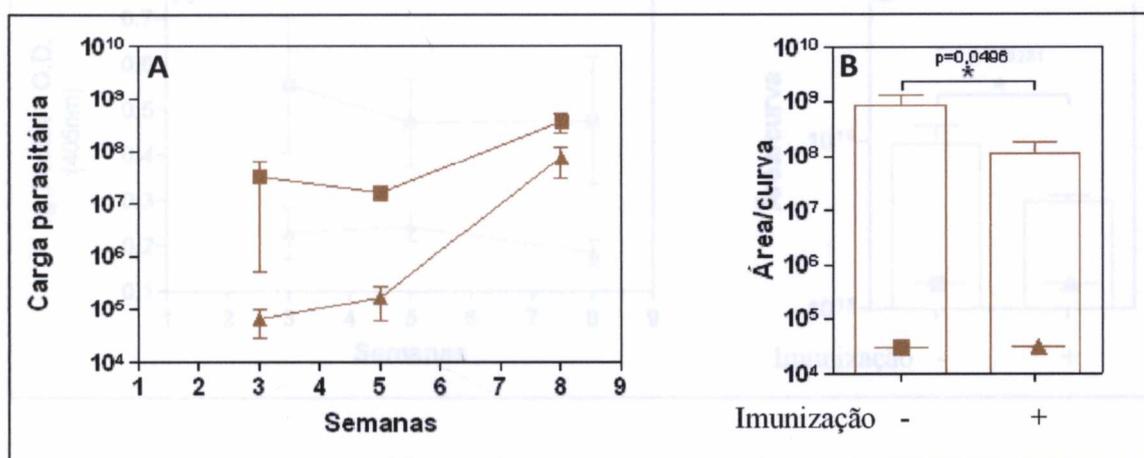


Figura 13 Avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* pelo método de Diluição Limitante. A: Animais desafiados com *L. braziliensis*, tratados com salina (quadrado) ou imunizados com SGS (triângulo). B: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=8-10 animais/grupo). * $p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.10 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* DURANTE A INFECÇÃO

Utilizando as mesmas amostras de soro, foi avaliada também a produção de anticorpos contra *Leishmania* durante a infecção (Fig. 14).

Os resultados mostram que os animais imunizados com a saliva de *L. longipalpis* produzem menos anticorpos contra *Leishmania* ao longo de toda infecção (Fig. 14). As concentrações de anticorpos nos animais não imunizados são cerca de três vezes maiores daquelas produzidas pelos animais imunizados na terceira semana (Fig. 14 A). Esta diferença reduz um pouco na quinta semana, mas ainda assim, as concentrações de anticorpos nos animais não imunizados é, em média, o dobro dos animais imunizados. Na oitava semana, esta diferença se mantém.

A análise estatística comparativa entre as áreas sobre as curvas entre os grupos de animais imunizados e não imunizados mostra que as diferenças observadas ao longo da infecção são significantes (Fig. 14 B).

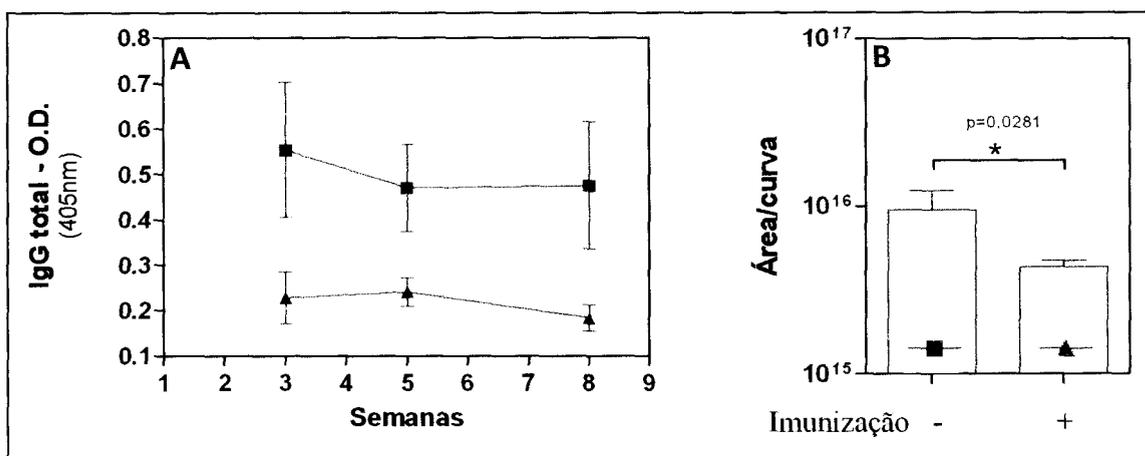


Figura 14 Níveis de anticorpos reagentes a *Leishmania* em soro de hamsters imunizados na orelha esquerda ou não com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias, 3, 5 e 8 semanas após o desafio na orelha direita com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* pelo método de ELISA. A: Animais desafiados com *L. braziliensis*, tratados com salina (quadrado) ou imunizados com SGS (triângulo). B: Cálculo da área sobre a curva de todos os grupos (n=11-12 animais/grupo). ** $p < 0,01$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

8.11 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO LINFONODO DRENANTE

O padrão de expressão de citocinas foi avaliado por PCR em tempo real nas células extraídas do linfonodo drenante dos animais imunizados ou não e desafiados somente com *L. braziliensis*, com o objetivo de identificar o perfil da resposta imune nestes animais (Fig. 15 – 17).

De modo similar aos demais grupos, dentre as citocinas avaliadas, o IFN- γ teve os níveis de expressão mais elevados (Fig. 15). Os níveis de expressão nos animais não imunizados são, em média, cerca de trinta vezes em relação aos animais *naïve* na terceira (Fig. 15 A) e quinta (Fig. 15 B) semanas após a infecção. Na oitava semana estes valores caem para, em média, vinte vezes (Fig. 15 C). Com relação aos animais imunizados, os níveis de expressão desta citocina são maiores. Desde a terceira semana a média é de cerca de setenta vezes (Fig. 15 A). A partir da quinta semana há uma ligeira redução para cerca de sessenta vezes (Fig. Fig. 15 B), que se mantém até a oitava semana (Fig. 15 C).

Apesar destas diferenças, não há relevância estatística entre estes grupos ao longo de todo o período da infecção avaliado, sugerindo que a proteção parcial contra *L. braziliensis* conferida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis*, é mediada por outra via que não a do IFN- γ .

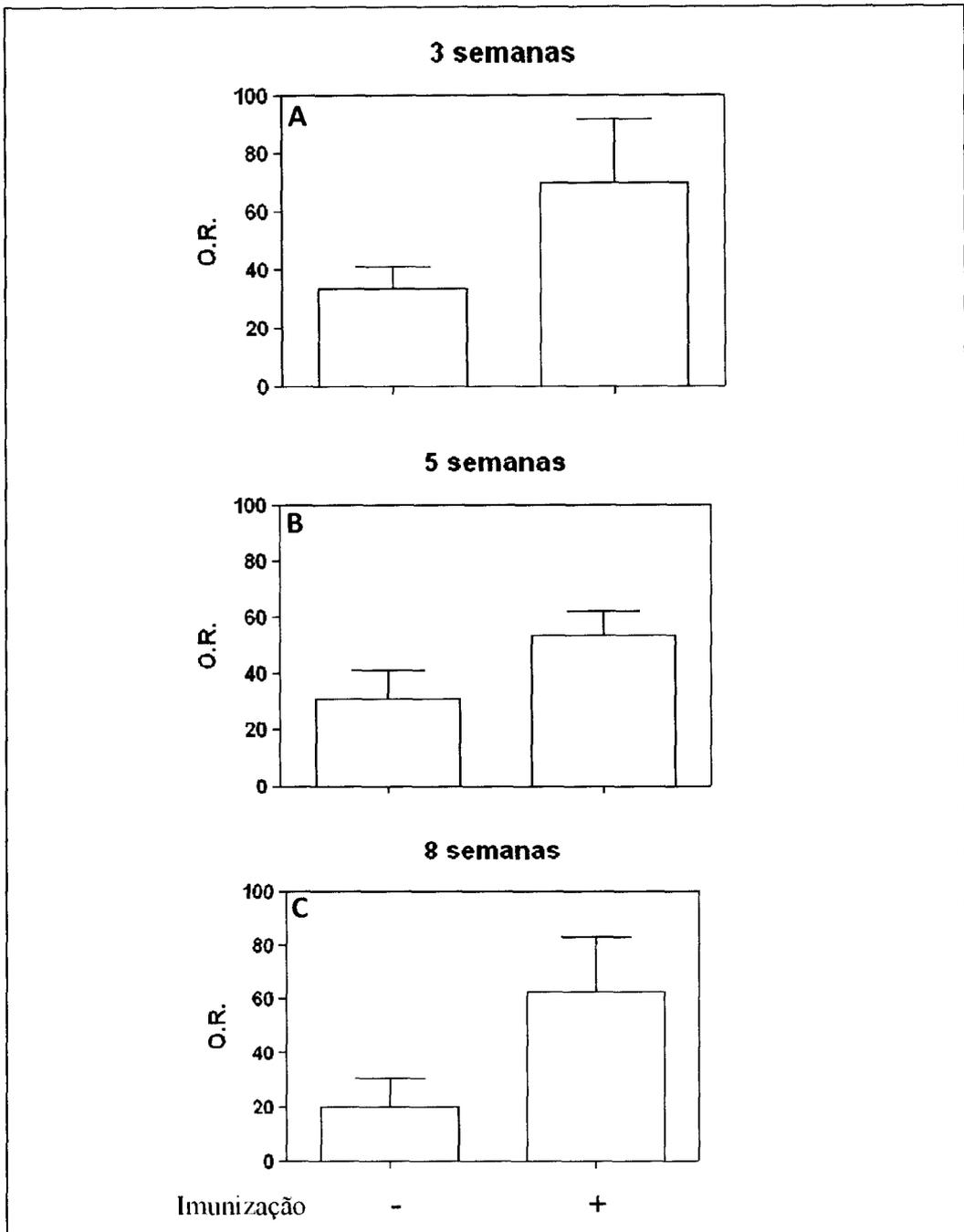


Figura 15 Avaliação dos níveis de expressão de IFN- γ por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados (+) por via intradérmica na orelha esquerda ou não (-) com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral. A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. (n=8-10 animais/grupo). $p > 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney).

Também os níveis de expressão de IL-10 foram avaliados através da mesma metodologia (Fig. 16).

Os resultados mostram que a quantidade relativa de expressão de IL-10 é baixa e se mantém praticamente inalterada durante os três momentos avaliados da infecção (Fig. 16). Na terceira semana, a média de expressão varia em torno de duas vezes em ambos os grupos, porém os animais imunizados com SGS de *L. longipalpis* expressam níveis estatisticamente menores de IL-10 em relação aos não imunizados (Fig. 16 A). Estes valores são mantidos sem grandes alterações na quinta semana, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos imunizados ou não imunizados neste ponto (Fig. 16 B). Na oitava semana após a infecção, os níveis de expressão desta citocina sofrem um ligeiro aumento em ambos grupos, porém sem relevância estatística neste ponto (Fig. 16 C).

Estes dados sugerem que o papel do IL-10 na proteção parcial contra a infecção por *L. braziliensis* conferida pela imunização com SGS de *L. longipalpis* se dá nos momentos iniciais da infecção.

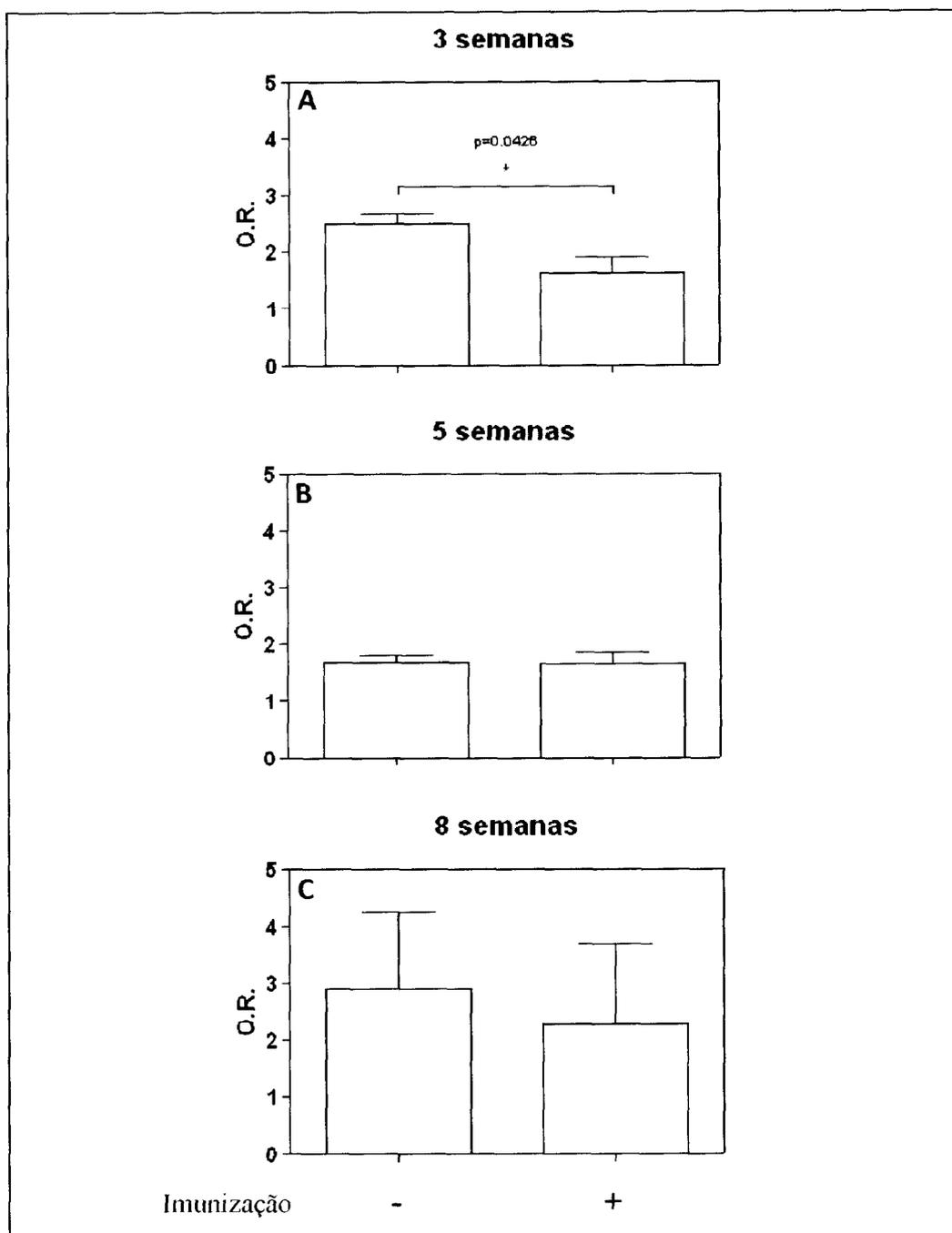


Figura 16 Avaliação dos níveis de expressão de IL-10 por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados (+) por via intradérmica na orelha esquerda ou não (-) com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias (n=6-10 animais/grupo). Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral. A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. * $p < 0,05$ (teste não paramétrico Mann-Whitney).

Da mesma forma, foram avaliados os níveis de expressão de TGF- β no linfonodo drenante dos hamsters desafiado somente com *L. braziliensis* (Fig. 17).

Os valores das quantificações relativas mostram que houve pouca alteração nos níveis de expressão desta citocina entre os animais submetidos à experimentação e os *naive* normais (Fig. 17). Porém existe diferença na cinética, bem como nas quantidades de expressão TGF- β entre os animais imunizados e não imunizados.

Na terceira semana, os níveis de expressão dos animais não imunizados são similares aos animais normais não infectados, uma vez que a quantificação do primeiro é, em média, uma vez em relação aos animais normais *naive* (Fig. 17 A). Com relação ao grupo de animais imunizados, há uma redução estatisticamente significativa de 30% na expressão de TGF- β na terceira semana quando comparados aos animais não imunizados (Fig. 17 A).

Os níveis de expressão desta citocina pelos animais imunizados permanecem praticamente inalterados até a quinta semana, enquanto há um ligeiro aumento naqueles animais não imunizados. Este aumento na expressão do TGF- β pelos animais não imunizados mantém a relevância estatística desta diferença neste ponto (Fig. 17 B).

Na oitava semana, há uma diminuição nos níveis de expressão dos animais imunizados para cerca da metade do que é observado nos animais normais não infectados. Também há uma redução de cerca de 25% nos níveis de expressão dos animais não imunizados em relação aos animais normais não infectados neste ponto (Fig. 17 B). Dessa forma, os valores de expressão do TGF- β se tornam similares neste ponto, não havendo diferença estatística entre eles (Fig. 17 C).

Os resultados obtidos com a avaliação dos níveis de expressão do TGF- β em hamsters infectados com *L. braziliensis* sugerem que o papel desta citocina na proteção parcial conferida pela imunização com SGS de *L. longipalpis* é relevante durante mais tempo ao longo da infecção.

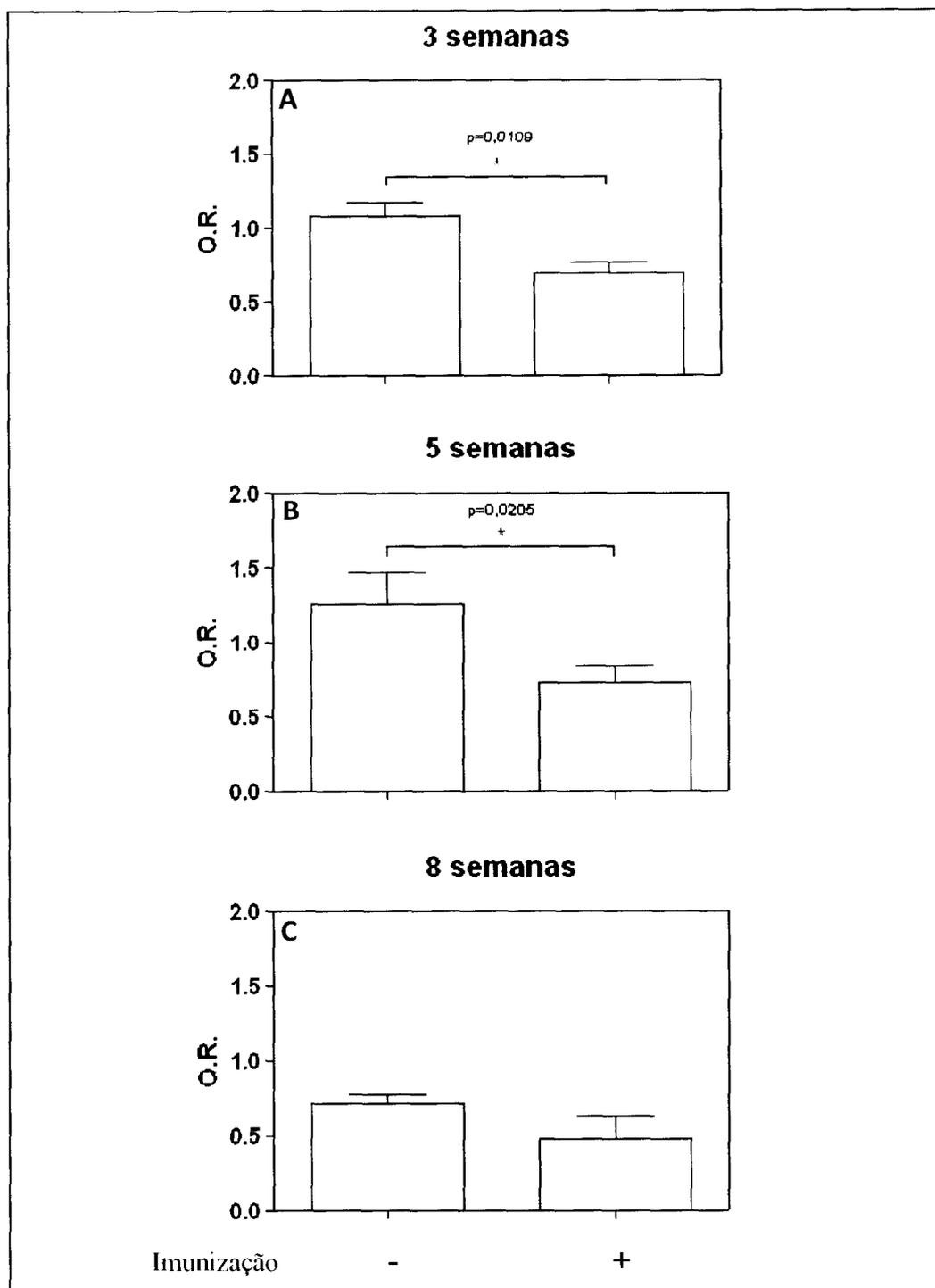


Figura 17 Avaliação dos níveis de expressão de TGF- β por PCR em tempo real no linfonodo drenante de hamsters imunizados (+) por via intradérmica na orelha esquerda ou não (-) com SGS de *L. longipalpis* equivalente a 0,5 pares por 3 vezes com intervalo de 15 dias ($n=7-10$ animais/grupo). Os animais foram desafiados com 10^5 formas promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha contralateral. A: 3 semanas após a infecção. B: 5 semanas após a infecção. C: 8 semanas após a infecção. * $p<0,05$ (teste não paramétrico Mann-Whitney).

7 DISCUSSÃO

O interesse no estudo sobre o papel da saliva de flebotomíneos na transmissão da *Leishmania* adquiriu atenção dos grupos de pesquisa desde o final do século passado. Foi neste momento que Titus e Ribeiro demonstraram que o desafio de camundongos com *L. major* na presença da saliva de *L. longipalpis* resultava no aumento da lesão, bem como na carga parasitária (TITUS & RIBEIRO, 1988). Desde então, este achado foi reafirmado em modelos com *L. braziliensis* (SAMUELSON *et al*, 1991), com *L. amazonensis* e diferentes concentrações de saliva (THEODOS *et al*, 1991), também com diferentes doses de *L. braziliensis* (LIMA & TITUS, 1996), além do modelo com *L. major* e saliva de *Phlebotomus papatasi* (BELKAID *et al*, 1998). Dentro deste contexto, surgiu a hipótese de que a pré-exposição à saliva induziria a produção de anticorpos específicos capazes de neutralizar o efeito exacerbador da saliva no momento do desafio com *Leishmania*. Resultados positivos foram obtidos desta hipótese testada num modelo que mimetiza melhor a biologia da transmissão natural, onde a pré-exposição à saliva praticamente anulou o efeito exacerbador da saliva (BELKAID *et al*, 1998).

Nossos resultados confirmam que a pré-exposição à saliva induz forte DTH (Fig. 1), bem como a produção de altos títulos de anticorpos contra a saliva (Fig. 2) em hamsters. O potencial de neutralização da pré-exposição à saliva não foi observado no tamanho da lesão desenvolvida pelos animais, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos de animais imunizados ou não (Fig. 3 e 11). Resultados similares foram obtidos por Oliveira e colaboradores, em 2004, onde diferentes cepas de *L. braziliensis* levam a diferentes desfechos da infecção (OLIVEIRA *et al*, 2004). Os autores relatam não haver relação entre o tamanho da lesão e a carga parasitária, provavelmente devido ao intenso infiltrado inflamatório gerado em resposta à infecção. O perfil de células observadas muda, mas persiste ao longo da infecção, com predominância de granulócitos e linfócitos nos momentos iniciais, com substituição destes por macrófagos e linfócitos mais tardiamente (OLIVEIRA *et al*, 2004). No entanto, foi observada redução na carga parasitária nas orelhas (Fig. 4 e 12) bem como nos linfonodos drenantes (Fig. 5 e 13) dos hamsters imunizados. Além disso, os animais imunizados apresentam maiores concentrações de anticorpos circulantes contra a saliva (Fig. 6) e menores concentrações de anticorpos contra *Leishmania* (Fig. 7 e 14). Com

relação à expressão de citocinas, nossos dados mostram que os hamsters expressam altos níveis de IFN- γ no linfonodo drenante da lesão, apesar de não haver diferença entre os animais imunizados e os não imunizados (Fig. 8 e 15). Os níveis de expressão de IL-10 (Fig. 9 e 16) são menores e parece ser uma via envolvida na proteção dos animais imunizados e desafiados na presença da saliva de *L. intermedia* (Fig. 9 B e C). Além disso, os níveis de expressão do TGF- β são similares aos de um hamster sadio (Fig. 10 e 17), porém observa-se uma redução significativa nos animais imunizados e desafiados somente com *L. braziliensis* (Fig. 17 A e B), bem como na presença das salivas de *L. longipalpis* ou *L. intermedia* (Fig. 10).

O pioneiro dos estudos sobre a resposta do hospedeiro à exposição à saliva de flebotomíneos utilizou SGS de *Phlebotomus papatasi* para demonstrar que a pré-sensibilização de camundongos com SGS e posterior desafio induzia forte DTH, caracterizado pela predominância de células mononucleares. Este intenso infiltrado inflamatório era visível com 18 horas após o desafio, tinha maior intensidade com 48 horas, mas se mantinha significativamente maior até 5 dias (BELKAID *et al*, 2000). Utilizando modelo experimental com hamster, este estudo é o primeiro a descrever este fenômeno. Nossos resultados são similares, uma vez que a houve predominância de células mononucleares no forte infiltrado inflamatório formado em resposta ao desafio com saliva de *L. longipalpis* (Fig. 1 B). Na tentativa de avaliar a possibilidade de proteção cruzada entre saliva de diferentes vetores, o fato da maior presença de mastócitos nas orelhas dos hamsters desafiados com saliva de *L. intermedia* chama a atenção (Fig. 1 E). A presença de mastócitos nos momentos iniciais da infecção é crucial para o controle da doença causada por *L. major* (MAURER *et al*, 2006). De acordo com as observações das lâminas, a presença da saliva de *L. intermedia* posterior à imunização com saliva de *L. longipalpis* induz um maior recrutamento de mastócitos para o local do desafio. Não existem relatos na literatura sobre os efeitos da saliva de *L. intermedia* em mastócitos, porém já se conhece o potencial em ativar estas células com diferentes espécies de *Leishmania* (BIDRI *et al*, 1997; DE OLIVEIRA *et al*, 2005; MAURER *et al*, 2006). Dessa forma, a presença de mastócitos nos momentos iniciais da infecção seria favorável ao hospedeiro, uma vez que contribuiria para a resolução da doença, além de sugerir a possibilidade de proteção cruzada. Além do intenso infiltrado inflamatório, camundongos expostos à saliva de *L. longipalpis* produzem anticorpos

específicos quando desafiados posteriormente com a saliva (SILVA *et al*, 2005). Nossos resultados foram muito similares, uma vez que os hamsters imunizados produziram altos títulos de anticorpos específicos contra a saliva de *L. longipalpis* (Fig. 2).

A alta susceptibilidade do hamster à *L. braziliensis* já era conhecida desde o início da década de 60 do século passado (THATCHER *et al*, 1965; WILSON *et al*, 1979; HERRER *et al*, 1979). Estes animais não curam a lesão espontaneamente, mas não apresentam lesões metastáticas em decorrência da infecção por *L. braziliensis* (TRAVI *et al*, 1988; ALMEIDA *et al*, 1996). Por isso, avaliamos o potencial protetor da imunização com a saliva neste modelo. Apesar dos resultados positivos com a imunização, obtidos com a indução do DTH, bem como com a produção de anticorpos, não foram observadas diferenças nos tamanhos de lesão dos hamsters imunizados quando comparados com aqueles não imunizados, independente do tipo de desafio que receberam (Fig. 3 e 11). Provavelmente devido ao intenso infiltrado inflamatório desenvolvido pela presença da *L. braziliensis* (OLIVEIRA *et al*, 2004), não tenha sido possível observar o caráter protetor da imunização com a saliva de *L. longipalpis*. No entanto, Thiakaki e colaboradores, em 2005, avaliaram o potencial protetor de imunizações com diferentes salivas de flebótomos em camundongos contra a infecção por *L. amazonensis*. Apesar de serem modelos diferentes, ambos são de alta susceptibilidade, uma vez que os camundongos também não curam espontaneamente a lesão causada por *L. amazonensis* (THIAKAKI *et al*, 2005). Neste trabalho, o grupo relata que a resposta imune induzida pela imunização com a saliva e *L. longipalpis* protege apenas contra um desafio feito na presença da mesma saliva. Contrariamente aos achados do referido trabalho, nos nossos dados, não há redução no tamanho da lesão nos animais imunizados com a saliva de *L. longipalpis*, independente do desafio recebido (Fig. 3 e 11). Uma vez que a saliva de *L. longipalpis* é muito imunogênica, provavelmente a resposta imune induzida pelas demais salivas utilizadas no estudo da Thiakaki não foi suficiente para controlar, mesmo que parcialmente, a infecção por *L. amazonensis*. Diferentemente, no nosso trabalho, todos os animais imunizados foram submetidos à mesma saliva no momento da vacinação. Utilizando um modelo de imunização semelhante, De Moura e colaboradores, em 2007, demonstraram que a pré-exposição à saliva de *L. intermedia* aumenta a infecção por *L. braziliensis* em camundongos (DE MOURA *et al*, 2007). O provável mecanismo envolvido nesta

exacerbação da doença seria o desenvolvimento de um padrão celular Th2 em resposta à vacinação. Além disso, a imunização com SGS de *L. intermedia* não levou ao desenvolvimento da reação de DTH (DE MOURA *et al*, 2007), favorecendo o estabelecimento e a persistência do parasita. Existem relatos na literatura sobre a associação entre aumento nas concentrações de IgG contra saliva de *L. longipalpis* e resposta imune celular protetora contra a *Leishmania* (GOMES *et al*, 2002).

Durante a infecção por *L. braziliensis* em humanos os títulos de anticorpos específicos contra a *Leishmania* aumentam, mas reduzem com o sucesso do tratamento contra a infecção. No entanto, pacientes resistente à terapia anti-*Leishmania* mantêm estes altos títulos de anticorpos (VOULDOUKIS *et al*, 1994). Dessa forma, a produção de anticorpos contra a *Leishmania* foi utilizada como parâmetro para avaliar a possibilidade de proteção. Nos grupos de animais desafiados na presença da saliva, aqueles imunizados produzem concentrações estatisticamente menores daqueles animais não imunizados (Fig. 7). Resultados semelhantes foram obtidos com os animais desafiados somente com *L. braziliensis* (Fig. 14). Uma vez que a menor produção de anticorpos anti-*Leishmania* está relacionada com proteção contra a infecção (VOULDOUKIS *et al*, 1994), nossos resultados apontam para o potencial protetor inespecífico conferido pela imunização com a saliva.

A presença da saliva de *L. longipalpis*, que já teve, por diversas vezes, seu potencial imunogênico demonstrado (TITUS & RIBEIRO, 1988; THEODOS *et al*, 1991; THEODOS & TITUS, 1993), induz a produção de anticorpos específicos que protegem contra uma posterior infecção (THIAKAKI *et al*, 2005). Esta hipótese de neutralização dos componentes salivares por anticorpos permitiria o desenvolvimento de resposta imune celular mais eficiente contra *Leishmania*. Gomes e colaboradores, em 2002, confirmaram que a indução da resposta imune contra a saliva está associada ao DTH contra *Leishmania*, favorável ao hospedeiro (GOMES *et al*, 2002). A avaliação da resposta imune humoral contra a saliva de *L. longipalpis*, demonstrou que os hamsters produzem anticorpos até cerca de 45 dias após a última imunização (Fig. 6). Mais uma vez, a alta imunogenicidade da saliva de *L. longipalpis* é demonstrada pelas concentrações elevadas de anticorpos naqueles animais imunizados e desafiados na presença desta (Fig. 6 A).

A influência do microambiente, bem como da genética do hospedeiro, além do vetor da *Leishmania* no desenvolvimento da infecção está bem estabelecido com diversos trabalhos descritos na literatura (LOCKSLEY *et al*, 1987; SCOTT *et al*, 1989; SOARES & BARCINSKI, 1991). Portanto, os diferentes desafios que os hamsters receberam poderiam levar a diferentes padrões de resposta.

O modelo experimental que utiliza agentes etiológicos da leishmaniose cutânea na orelha foi desenvolvido em camundongos na tentativa de mimetizar melhor os aspectos envolvidos na infecção natural por *Leishmania*. Desde a presença da saliva até a dose de parasitas foram considerados. Os resultados obtidos a partir da análise do perfil de citocinas mostram que a presença da saliva aumenta a frequência de células epidérmicas produtoras de citocinas do tipo Th2, porém a pré-exposição dos animais à saliva reverte estes efeitos (BELKAID *et al*, 1998). No entanto, em hamsters imunizados com a saliva de *L. longipalpis* e desafiados na presença da mesma saliva, observa-se apenas uma tendência de redução na carga parasitária da orelha destes animais (Fig. 4 A e C). Provavelmente, as elevadas concentrações de anticorpos produzidos nestes animais em resposta à imunização podem ter favorecido a formação de imunocomplexos (NYDEGGER, 2007). Existem relatos na literatura que demonstram que a presença destes imunocomplexos pode induzir um alternativo estado de ativação de macrófagos, afetando o desfecho da infecção por favorecer a sobrevivência e a proliferação do parasita (RAES *et al*, 2007). A provável via mediadora desta ativação alternativa de macrófagos se dá através da combinação entre estímulos inflamatórios, como fragmentos do ácido hialurônico na matriz extracelular gerados no local da infecção, e a ligação do receptor Fc a amastigotas opsonizados (YANG *et al*, 2007). Além disso, altos níveis de IgG e IL-10 são fatores preditivos para leishmaniose visceral ativa. Por fim, culturas de monócitos com *Leishmania* incubadas com soro de pacientes com a forma visceral da doença produzem altos níveis de IL-10 (MILES *et al*, 2005). Dessa forma, estes fatores podem ter influenciado o controle da *Leishmania* no local da infecção destes animais (Fig. 4 A). Entretanto, quando avaliada a carga parasitária na orelha dos animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia*, há uma redução significativa na quantidade de parasitas nos animais imunizados (Fig. 4 B e C). Da mesma forma, resultados semelhantes foram obtidos com os animais imunizados e desafiados somente com *L. braziliensis*, onde a quantidade de

parasitas na orelha é estatisticamente menor quando comparada com os animais não imunizados (Fig. 12 A e B). Uma vez que as concentrações de anticorpos produzidos pelos animais imunizados e desafiados com SGS de *L. intermedia* ou sem saliva foram menores (Fig. 6 B), é provável que a formação de imunocomplexos também tenha sido menor. Dessa forma, o controle dos parasitas no local da infecção foi mais eficiente, este fator imunossupressor estaria menos presente (Fig. 4 C e 13 B). Estes resultados indicam, portanto, que a resposta imune protetora induzida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* é inespecífica.

Amplamente discutido pela literatura, está o caráter específico da proteção conferida pela imunização com a saliva (VOLF & ROHOUSOVÁ, 2001). Diversos trabalhos demonstram que a pré-exposição dos animais à saliva confere proteção contra um desafio posterior com *Leishmania* na presença da mesma saliva utilizada na imunização. O potencial protetor é consequência das propriedades imunogênicas da saliva, independente de advir do vetor natural da *Leishmania* causadora da infecção em estudo (BELKAID *et al*, 1998; 2000; VALENZUELA *et al*, 2001) ou não (THIAKAKI *et al*, 2005). Assim sendo, os hamsters foram imunizados ou não com saliva de *L. longipalpis* e desafiados posteriormente com *L. braziliensis* na presença da mesma saliva. De acordo com as observações feitas em outros estudos que utilizaram modelo semelhante de vacinação, há redução significativa da carga parasitária nos animais imunizados com relação aos não imunizados (THIAKAKI *et al*, 2005). De modo similar, observa-se uma redução significativa na carga parasitária no linfonodo drenante dos hamsters imunizados, que continua aumentando com o tempo de infecção, mas ainda assim mantém essa diminuição (Fig. 5 A e C). Apesar da vacinação com a saliva de *L. longipalpis* ser amplamente estudada em diversos modelos, este é o primeiro relato em hamsters. Quando pré-expostos à saliva de *L. longipalpis*, estes animais desenvolvem forte DTH (Fig. 1 B) e altos títulos de anticorpos contra saliva (Fig. 6 A). A presença da saliva altera o microambiente local por modificar o padrão de citocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células humanas (COSTA *et al*, 2004). Portanto, a resposta imune dos hamsters, bem como a presença da saliva no desafio, provavelmente favorece o hospedeiro nos momentos iniciais da infecção, uma vez que a carga parasitária no linfonodo drenante destes animais é baixa na terceira semana (Fig. 5 A). A influência da genética do hospedeiro na virulência da *Leishmania*

é bem conhecida. Desde a mudança na expressão gênica durante a diferenciação de promastigota para amastigota (SMIRLIS *et al*, 2006; SRIVIDYA *et al*, 2007) até a interação entre moléculas do parasita com o sistema imune do hospedeiro (CHANG & MCGWIRE, 2002) influenciam na virulência da *Leishmania* e, conseqüentemente, no desfecho da doença. Apesar desta resposta inicial protetora (Fig. 5 A), os hamsters não conseguem manter o controle da infecção e a carga parasitária aumenta na quinta semana (Fig. 5 A) e ainda mais na oitava (Fig. 5 A). No entanto, a imunização com a saliva parece induzir uma resposta protetora, levando à redução na carga parasitária dos animais pré-expostos (Fig. 5 C).

Em áreas endêmicas para leishmaniose, é provável que indivíduos em risco de exposição à flebotomíneos sejam mais frequentemente picados por vetores de diferentes espécies não infectados. Uma vez que diversas espécies de vetores são encontradas numa mesma região (JANINI *et al*, 1995; TOPRAK & OZER, 2005; REZA & MANSOUR, 2006) e, em sua maioria, não estão infectados (JORQUERA *et al*, 2005; PITA-PEREIRA *et al*, 2005; PAIVA *et al*, 2006; CÓRDOBA-LANÚS, 2006), se torna necessário determinar se existem componentes antigênicos comuns a todas às espécies relevantes para a imunidade protetora contra a *Leishmania* na presença da saliva. No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre este tema. Neste sentido, os hamsters foram imunizados ou não com a saliva de *L. longipalpis* e desafiados com *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia*. De acordo com os resultados obtidos com a avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante destes animais, existe a possibilidade de proteção cruzada entre estas diferentes salivas, uma vez que os animais imunizados apresentaram valores estatisticamente menores de parasitas em relação aos não imunizados no início da infecção (Fig. 5 B e C). Estes resultados diferem daqueles obtidos no modelo também de alta susceptibilidade em camundongos, onde foi demonstrado que a imunização com a saliva de *P. papatasi* ou *P. sergenti* não protege contra um desafio na presença da saliva de *L. longipalpis* (THIAKAKI *et al*, 2005). Embora os modelos não sejam comparáveis e este é o primeiro relato utilizando os hamsters como modelo experimental, as salivas empregadas no estudo em camundongos são originadas de vetores pertencentes a gêneros diferentes. Uma vez que estes flebotomíneos são mais distantes taxonomicamente, a probabilidade de existirem mais diferenças na composição salivar destes vetores é maior (WAHBA & RIERA,

2006), o que reduziria as chances de proteção cruzada. Ainda assim, este e outros trabalhos, mostram que, apesar de fraca, há reação cruzada entre saliva de diferentes vetores (VOLF & ROHOUSOVÁ, 2001; THIAKAKI *et al*, 2005).

Este também é o primeiro relato sobre os efeitos da saliva de *L. intermedia* em hamsters. Como demonstrado, há indução de DTH nos animais imunizados com saliva de *L. longipalpis* e desafiados com a saliva de *L. intermedia* (Fig. 1 E). Além disso, há uma maior frequência de células morfológicamente semelhantes à mastócitos nestas lâminas (Fig. 1 F), provavelmente recrutadas pelos componentes diferenciais da saliva de *L. intermedia*. Apesar de não existirem relatos na literatura sobre os efeitos da saliva de flebotomos em mastócitos, sabe-se que este tipo celular pode influenciar a resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania*, uma vez que participa da primeira linha de defesa, isto é, imunidade inata, durante a infecção cutânea (BIDRI *et al*, 1997). Por conta disso, camundongos geneticamente deficientes em mastócitos submetidos à infecção por *L. major*, apresentam doença mais grave. Além disso, os mastócitos parecem ser fundamentais no recrutamento de células efetoras da imunidade inata e adaptativa (MAURER *et al*, 2006). O provável mecanismo pelo qual isso acontece é através do influxo inicial de macrófagos que é dependente da produção de MIP-1 α/β por neutrófilos recrutados pela secreção de TNF- α pelos mastócitos (VON STEBUT *et al*, 2003). Apesar de estes estudos utilizarem camundongos como modelo experimental, mastócitos de diferentes hospedeiros respondem à *Leishmania* de formas diferentes (SAHA *et al*, 2004).

Na tentativa de confirmar a possibilidade de a resposta imune protetora induzida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* ser inespecífica, um grupo de hamsters foi imunizado ou não e desafiado somente com *L. braziliensis*. Os resultados obtidos com a avaliação da carga parasitária no linfonodo drenantes destes animais confirma a inespecificidade desta proteção, uma vez que houve redução estatisticamente significativa da quantidade de parasitas nos animais imunizados (Fig. 13 A e B). Resultados similares foram obtidos também num modelo de alta susceptibilidade, onde os animais não curam a lesão cutânea (THIAKAKI *et al*, 2005). Estes dados não eliminam a importância da imunidade humoral contra a saliva, uma vez que os parasitos são transmitidos naturalmente pelos vetores flebotomíneos e, então, sempre co-inoculados com as proteínas salivares. Além disso, a produção de altas concentrações de

anticorpos específicos contra a saliva induzida pela imunização pode facilitar o desenvolvimento de uma resposta imune celular contra a *Leishmania* (GOMES *et al*, 2002), favorecendo o hospedeiro. Este fato se dá provavelmente pelas propriedades imunogênicas ou imunossupressoras da saliva de diferentes vetores flebotômicos que, em cada caso, modificam a resposta do hospedeiro contra a *Leishmania*. Também devem ser considerados outros mecanismos de resposta não específicos que podem estar envolvidos, como a resposta imune inata via ativação de células T $\gamma\delta$ (ROSAT *et al*, 1993), bem como de células NK (SCHARTON-KERSTER & SCOTT, 1995; BAJÉNOFF *et al*, 2007).

De acordo com diversos modelos experimentais, os mecanismos da imunidade celular medeiam resistência à *Leishmania*. Em modelos murinos, amplamente estudados, a resistência à infecção por *L. major* está associada com a capacidade de células T CD4⁺, do subtipo Th1, em produzir IFN- γ , que ativam macrófagos parasitados (HEINZEL *et al*, 1991). Inversamente, a progressão da doença neste modelo está relacionada com a produção de citocinas, como IL-10, por outro subtipo de células T (Th2) e de TGF- β por macrófagos infectados (BARRAL-NETTO *et al*, 1992). Poucos são os trabalhos que estudam se a resposta imune de hamsters contra a forma cutânea da leishmaniose é semelhante a este perfil visto em camundongos. Apesar de relacionado com resistência à infecção, altos níveis de RNAm de IFN- γ são expressos em hamsters infectados com *L. panamensis*, sob a qual estes animais também não apresentam cura espontânea (TRAVI *et al*, 2002). De modo muito similar, os hamsters imunizados ou não com saliva de *L. longipalpis* e desafiados na presença da saliva de diferentes vetores expressaram altos níveis de IFN- γ (Fig. 8 A, B e C). No entanto, observa-se aumento estatisticamente significativo na expressão desta citocina apenas nos momentos iniciais da infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia* em animais imunizados (Fig. 8 A). Nos demais pontos e grupos avaliados ao longo da infecção, não há diferença estatística (Fig. 8 A, B e C). Estes dados corroboram com o trabalho anterior, no qual o aparecimento de lesões mais graves em hamsters não estava relacionado com a redução nos níveis de expressão de IFN- γ (TRAVI *et al*, 2002), como esperado pelos modelos em camundongos (SATOSKAR *et al*, 1998). No entanto, esta maior susceptibilidade estava associada a um aumento na expressão de citocinas como IL-4 e IL-10 (TRAVI *et al*, 2002), mesmo sendo um aumento de pequena magnitude.

Os níveis de expressão de IFN- γ também são altos nos hamsters desafiados somente com *L. braziliensis* (Fig. 15 A), porém, da mesma forma, não há diferença entre os animais imunizados e não imunizados (Fig. 15 B). De acordo com estes dados e com os relatos da literatura, o mecanismo responsável pela proteção conferida pela imunização com a saliva de *L. longipalpis* parece ser mediado pela modulação de outras citocinas.

Com relação aos níveis de expressão de IL-10, os valores são similares aos hamsters normais não infectados (Fig. 9 A e B). Apenas na oitava semana após a infecção há um aumento de expressão nos animais não imunizados, enquanto os valores de expressão nos animais imunizados se mantêm praticamente inalterados (Fig. 9 A e B). Este padrão misto de citocinas Th1/Th2 pode estar associado com susceptibilidade (OSORIO *et al*, 2003) e parece estar envolvido na proteção dos animais desafiados na presença da saliva de *L. intermedia*, uma vez que há diferença estatística em relação aos animais não imunizados (Fig. 9 B e C). No entanto, IL-10 não parece estar envolvida na proteção dos animais desafiados somente com *L. braziliensis* (Fig. 16 A e B).

Por fim, os animais imunizados apresentam uma redução nos níveis de expressão de TGF- β (Fig. 10 A, B e Fig. 17 A). Porém, este mecanismo parece estar envolvido na proteção dos animais desafiados somente com *L. braziliensis* (Fig. 10 B e C) ou na presença da saliva de *L. intermedia* (Fig. 17 A e B), uma vez que foi observada diferença estatística entre os animais imunizados e não imunizados destes grupos. Este fenômeno também é observado em hamsters infectados com *L. donovani*, porém o mecanismo envolvido nesta redução é desconhecido (MELBY *et al*, 2001).

IL-4 também tem sido associada com maior gravidade da doença em modelo murino infectados com *L. major* (MORRIS *et al*, 1993) e em hamster, com *L. panamensis* (TRAVI *et al*, 2002), embora seu papel promotor da doença pareça ser dependente da cepa do agente etiológico (NOBEN-TRAUTH *et al*, 1999). Dessa forma, IL-4 pode ser também mais um fator favorável à *L. braziliensis* neste modelo em hamster envolvido na proteção dos animais desafiados na presença da saliva de *L. longipalpis*.

Nossos resultados demonstram, portanto, o potencial imunogênico da saliva de *L. longipalpis* e o caráter inespecífico da proteção conferida pela imunização com estes componentes salivares.

8 CONCLUSÃO

A imunização com a saliva de *L. longipalpis* confere proteção parcial contra um desafio posterior com *L. braziliensis* independente da presença da saliva.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRIN, F. & ALI, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. 1997. *Infect Immun*, 65 (6): 2371-7.
- AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. 2000. *J Parasitol*, 86 (4): 730-5.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.; RUSSELL, D. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. 1999. *J Cell Sci*, 112 (18): 2993-3002.
- ALMEIDA, M.; CUBA-CUBA, C.; MORAES, M.; MILES, M. Dissemination of *Leishmania braziliensis*. 1996. *J Comp Pathol*, 115 (3): 311-6.
- ANDRADE, Z.; REED, S.; ROTERS, S.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. 1984. *Am J Pathol*, 114 (1): 137-48.
- BAJÉNOFF, M.; BREART, B.; HUANG, A.; QI, H.; CAZARETH, J.; BRAUD, V.; GERMAIN, R.; GLAICHENHAUS, N. Natural killer cell behaviour in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. 2007. *J Exp Med*, 203 (3): 619-631.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.; BROWNELL, C.; TWARDZIK, D.; REED, S. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (8): 3442-6.
- BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BONFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. 1995. *Am J Trop Med Hyg*, 53 (3): 256-9.
- BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.; VALENZUELA, J.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? 2000. *Am J Trop Méd Hyg*, 62 (6): 740-5.
- BARRAL-NETTO, M.; CARDOSO, S.; BARRAL, A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. 1987. *Acta Trop*, 44 (1): 5-11.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.; SKEIKY, Y.; ELLINGSWORTH, L.; TWARDZIK, D.; REED, S. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. 1992. *Science*, 257 (5069): 545-8.

BASTIEN, P. & KILLICK-KENDRICK, R. *Leishmania tropica* infection in hamsters and a review of the animal pathogenicity of this species. 1992. *Exp Parasitol*, 75 (4): 433-41.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains *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. 2005. *J Immunol*, 174 (11): 7160-71.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. 1998. *J Exp Med*, 188 (10): 1941-53.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. 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. 2000. *J Immunol*, 165 (2): 969-77.

BEZERRA, H. & TEIXEIRA, M. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania braziliensis* infection in BALB/c mice. 2001. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 (3): 349-51.

BIDRI, M.; VOULDOUKIS, I.; MOSSALAYI, M.; DEBRÉ, P.; GUILLOSSON, J.; MAZIER, D.; AROCK, M. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. 1997. *Parasite Immunol*, 19 (10): 475-83.

BITTENCOURT, A. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. 1995. *Tropical Pathology, 2ed. Berlin: Springer Verlag*, 8: 597-644.

CAMPOS-NETO, A. & BUNN-MORENO, M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. 1982. *Infect Immun*, 38 (3): 871-6.

CARVALHO, E.; JOHNSON, W.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.; COSTA, J.; REED, S.; ROCHA, H. 1985. *135 (6): 4144-8.*

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDÓN, A. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. 1983. *Clin Immunol Immunopathol, 27 (2): 176-86.*

CHANG, K. & MCGWIRE, B. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. 2002. *Kinetoplast Biol Dis, 1:1.*

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J. Toward na understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of the hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. 1999. *Proc Natl Acad Sci USA, 96 (26): 15155-60.*

CONNELL, N.; MEDINA-ACOSTA, E.; MCMASTER, W.; BLOOM, B.; RUSSEL, D. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA, 90 (24): 11473-7.*

CONVIT, J.; PINARDI, M.; RONDÓN, A. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to na immunological defect of the host. 1972. *Trans R Soc Trop Med Hyg, 66 (4): 603-10.*

COOK, J.; HOLBROOK, T.; DOUGHERTY, W. Protective effect of glucan against visceral leishmaniasis in hamsters. 1982. *Infect Immun, 37 (3): 1261-9.*

CÓRDOBA-LANÚS, E.; DE GROSSO, M.; PIÑERO, J.; VALLADARES, B.; SALOMÓN, O. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* ssp. in northwestern Argentina. 2006. *Acta Trop, 98 (1): 1-5.*

COSTA, D.; FAVALI, C.; CLARÊNCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEIÇÃO, V.; MIRANDA, J.; TITUS, R.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. 2004. *Infect Immun, 72 (3): 1298-305.*

DE MOURA, T.; NOVAIS, F.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. Toward a novel experimental modelo f

infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. 2005. *Infect Immun*, 73 (9): 5827-34.

DE OLIVEIRA, M.; LIMA, M.; CALHEIROS, A.; MARTINS, M.; ANTAS, P.; DE LUCA, P.; PIRMEZ, C. *Leishmania braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. 2005. *Exp Parasitol*, 109 (2): 72-9.

DONNELLY, K.; LIMA, H.; TITUS, R. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. 1998. *J Parasitol*, 84 (1): 97-103.

ETGES, R. & MÜLLER, I. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulation and inhibitory interactions. 1998. *J Mol Med*, 76 (6): 372-90.

FARRELL, J. *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. 1976. *Exp Parasitol*, 40 (1): 89-94.

FRASER, J. & WEISS, A. Regulation of T-cell lymphokine gene transcription by the accessory molecule CD28. 1992. *Mol Cell Biol*, 12 (10): 4357-63.

FREEMAN, G.; GRIBBEN, J.; BOUSSIOTIS, V.; NG, J.; RESTIVO, V.; LOMBARD, L.; GRAY, G.; NADLER, L. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. 1993. *Science*, 262 (5135): 909-11.

FORATTINI, O.; PATTOLI, D.; RABELLO, E.; FERREIRA, O. Natural infection of phlebotomine in an enzootic focus of cutaneous leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. 1972. *Rev Saúde Pública*, 6 (4): 431-3.

GARG, R.; GUPTA, S.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; SUNDAR, S.; DUBE, A. Immunostimulatory cellular responses of cured *Leishmania*-infected patients and hamsters against the integral membrane proteins and non-membranous soluble proteins of a recent clinical isolate of *Leishmania donovani*. 2005. *Clin Exp Immunol*, 140 (1): 149-56.

GOLDMAN, L.; JOHNSON, P.; RAMSEY, J. The insect bite reaction. The mechanism. 1952. *J Invest Dermatol*, 18 (5): 403-18.

GOMES, R.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C.; COSTA, J.; MIRANDA, J.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. 2002. *J Infect Dis*, 186 (10): 1530-4.

GRIMALDI, G. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. 1982. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 77 (2): 195-215.

HALL, L. & TITUS, R. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophages functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. 1995. *J Immunol*, 155 (7): 3501-6.

HEINZEL, F.; SADICK, M.; MUTHA, S.; LOCKSLEY, R. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. 1991. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (16): 7011-5.

HERRER, A.; TELFORD, S.; CHRISTENSEN, H. *Leishmania braziliensis*: dissemination of panamanian strains in golden hamsters. 1979. *Exp Parasitol*, 48: 359-363.

HOWARD, J.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. 1980. *Parasite Immunol*, 2 (4): 303-14.

JAMES, A. & ROSSIGNOL, P. Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. 1991. *Parasitol Today*, 7 (10): 267-71.

JANINI, R.; SALIBA, E.; KAMHAWI, S. Species composition of sand flies and population dynamics of *Phlebotomus papatasi* in the southern Jordan Valley, an endemic focus of cutaneous leishmaniasis. 1995. *J Med Entomol*, 32 (6): 822-6.

JARECKI-BLACK, J.; GLASSMAN, A.; HOLBROOK, T. The effect of BCG-vaccine upon experimental visceral leishmaniasis in hamsters. 1984. *Ann Clin Lab Sci*, 14 (6): 464-6.

JORQUERA, A.; GONZÁLEZ, R.; MARCHÁN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* ssp. captured in

an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. 2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 (1): 45-8.

KAHL, L.; BYRAM, J.; DAVID, J. *Leishmania braziliensis* isolated from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Três Braços, Bahia, Brazil, differ in virulence for the golden hamster. 1990. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84 (6): 783-4.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. 2000. *Science*, 290 (5495): 1351-4.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. 1990. *Med Vet Entomol*, 4 (1): 8-24.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. 1987. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82 (3): 421-4.

LAINSON, R. & STRANGWAYS-DIXON, J. The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras : II. Reservoir-host of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. 1964. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 58: 136-53.

LERNER, E. & SHOEMAKER, C. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. 1992. *J Biol Chem*, 267 (2): 1062-6.

LEWIS, D. Phlebotomid sandflies. 1971. *Bull World Health Organ*, 44 (4): 535-51.

LEWIS, D. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. 1974. *Annu Rev Entomol*, 19: 363-84.

LIMA, H. & TITUS, R. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. 1996. *Infect Immun*, 64 (12): 5442-5.

LINSLEY, P.; GREENE, J.; TAN, P.; BRADSHAW, J.; LEDBETTER, J.; ANASETTI, C.; DAMLE, N. Coexpression and function cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. 1992. *J Exp Med*, 176 (6): 1595-604.

- LOCKSLEY, R. & SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. 1991. *Immunol Today*, 12 (3): 58-61.
- MARTINS, A. & MORALES-FARIAS, E. On the geographic distribution of American Phlebotomus species (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae). 1972. *Ver Bras Biol*, 32 (3): 361-71.
- MAURER, M.; KOSTHA, S.; SIEBENHAAR, F.; MOELLE, K.; METZ, M.; KNOP, J.; VON STEBUT, E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. 2006. *FASEB J*, 20: 2460-2467.
- MIKHAIL, J. & MANSOUR, N. *Leishmania donovani*: therapeutic and prophylactic action antimony dextran glycoside (RL-712) in the golden hamster. 1975. *Exp Parasitol*, 37 (3): 348-52.
- MORRIS, L.; TROUTT, A.; MCLEOD, K.; KELSO, A.; HANDMAN, E.; AEBISCHER, T. Interleukin-4 but not interferon gamma production correlates with the severity of murine cutaneous leishmaniasis. 1993. *Infect Immun*, 61 (8): 3459-65.
- MORRIS, R.; SHOEMAKER, C.; DAVID, J.; LANZARO, G.; TITUS, R. Sand fly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. 2001. *J Immunol*, 167 (9): 5226-30.
- MOSSER, D. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. 1994. *Immunol Ser*, 60: 99-114.
- MURPHY, M.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.; HUNTER, C.; FARRELL, J. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. 2001. *Eur J Immunol*, 31 (10): 2848-56.
- MURRAY, H.; RUBIN, B.; CARRIERO, S.; ACOSTA, A. Reversible defect in antigen-induced lymphokine and gamma-interferon generation in cutaneous leishmaniasis. 1984. *J Immunol*, 133 (4): 2250-4.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. 1992. *FASEB J*, 6 (12): 3051-64.

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

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W.; SACKS, D. IL-4 and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. 1999. *J Immunol*, 162 (10): 6132-40.

O'DALY, J. & CABRERA, Z. Immunization of hamsters with TLCK-killed parasites induces protection against *Leishmania* infection. 1986. *Acta Trop*, 43 (3): 225-36.

OSORIO, Y.; MELBY, P.; PIRMEZ, C.; CHANDRASEKER, B.; GUARÍN, N.; TRAVI, B. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. 2003. *Parasite Immunol*, 25: 139-148.

PAIVA, B.; SECUNDINO, N.; NASCIMENTO, J.; PIMENTA, P.; GALATI, E.; JUNIOR, H.; MALAFRONTTE, R. Detection and identification of *Leishmania* species in Field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. 2006. *Acta Trop*, 99 (2-3): 252-9.

PEARSON, R. & SOUSA, A. Clinical spectrum of Leishmaniasis. 1996. *Clin Infect Dis*, 22 (1): 1-13.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C.; SOUZA, M.; BRAZIL, R.; BERTHO, A.; DE FIGUEIREDO BARBOSA, A.; BRITTO, C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. 2005. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99 (12): 905-13.

RIBEIRO, J.; VACHEREAU, A.; MODI, G.; TESH, R. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. 1989. *Science*, 243 (4888): 212-4.

RIBEIRO, J.; ROWTON, E.; CHARLAB, R. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. 2000. *Insect Biochem Mol Biol*, 30 (4): 271-7.

RIBEIRO, J.; KATZ, O.; PANNELL, L.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. 1999. *J Exp Biol*, 202 (11): 1551-9.

RIBEIRO, J.; ROWTON, E.; CHARLAB, R. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. 2000. *Insect Biochem*, 30 (4): 271-7.

RIVIER, D.; SHAR, R.; BOVAY, P.; MAUEL, J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. 1993. *Parasite Immunol*, 15 (2): 75-84.

REINER, S. & LOCKSLEY, R. The regulation of immunity to *Leishmania major*. 1995. *Annu Rev Immunol*, 13: 151-177.

REY, J.; TRAVI, B.; VALENCIA, A.; SARAIVA, N. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. 1990. *Am J Trop Med Hyg*, 43 (6): 623-31.

REZA, F. & MANSOUR, N. Entomological studies of *Phlebotomus papatai* and *P. sergenti* as vectors of cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. 2006. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37 (3): 115-7.

ROGERS, K.; DEKREY, G.; MBOW, M.; GILLESPIE, R.; BRODSKYN, C.; TITUS, R. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. 2002. *FEMS Microbiol Lett*, 209 (1): 1-7.

ROHOUSOVA, I.; VOLF, P.; LIPOLDOVÁ, M. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. 2005. *Parasite Immunol*, 27 (12): 469-73.

ROMERO, G.; VINITIUS, M.; GOMES, M.; OLIVEIRA, V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* and *L. guyanensis* in Brazil. 2001. *Clin Infect Dis*, 32 (9): 1304-12.

ROSAT, J.; MACDONALD, H.; LOUIS, J. A role for gamma delta + T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. 1993. *J Immunol*, 150 (2): 550-5.

SACKS, D.; SARAIVA, E.; ROWTON, E.; TURCO, S.; PIMENTA, P. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. 1994. *Parasitology*, 108: S55-62.

SACKS, D. & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. 2001. *Annu Rev Microbiol*, 55: 453-83.

SAHA, B.; TONKAL, A.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. 2004. *Clin Exp Immunol*, 137 (1): 19-23.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. 1991. *J Exp Med*, 173 (1): 49-54.

SARAVIA, N.; HAZBÓN, M.; OSORIO, Y.; VALDERRAMA, L.; WALKER, J.; SANTRICH, C.; CORTÁZAR, T.; LEBOWITZ, J.; TRAVI, B. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. 2005. *Vaccine*, 23 (8): 984-95.

SATOSKAR, A.; AL-QUASSI, H.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance against *Leishmania Mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN-gamma production by female but not male DBA/2 mice. 1998. *Immunol Cell Biol*, 76 (2): 159-66.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; COFFMAN, R.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. 1989. *Immunol Rev*, 112: 161-82.

SCHARTON-KERSTEN, T. & SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. 1995. *J Leukoc Biol*, 57 (4): 515-22.

SARAVIA, N.; ESCORCIA, B.; OSORIO, Y.; VALDERRAMA, L.; BROOKS, D.; ARTEAGA, L.; COOMBS, G.; MOTTRAM, J.; TRAVI, B. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. 2006. *Vaccine*, 24 (19): 4247-59.

SCOTT, P.; CASPAR, P.; SHER, A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. 1990. *J Immunol*, 144 (3): 1075-9.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

(http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27512)

- SHERLOCK, I. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. 1996. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91 (6): 671-83.
- SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c caused NY natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. 2005. *Am J Trop Med Hyg*, 72 (1): 94-8.
- SINAGRA, A.; RIARTE, A.; LUNA, C.; CAMPANINI, A.; SEGURA, E. *Leishmania braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. 1997. *Am J Trop Med Hyg*, 57 (1): 115-8.
- SMIRLIS, D.; BISTI, S.; XINGI, E.; KONIDOU, G.; THIAKAKI, M.; SOTERIADOU, K. *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity *in vivo*. 2006. *Mol Microbiol*, 60 (6): 1457-73.
- SOARES, L. & BARCINSKI, M. Differential production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by macrophages from mice susceptible and resistant to *Leishmania mexicana amazonensis*. 1991. *J Leukocyte Biol*, 51: 220-224.
- SRIVIDYA, G.; DUNCAN, R.; SHARMA, P.; RAJU, B.; NAKHASI, H.; SALOTRA, P. Transcriptome analysis during the process of *in vitro* differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. 2007. *Parasitology*, 134 (11): 1527-39.
- TAKASHIMA, A. & BERGSTRESSER, P. Cytokine-mediated communication by keratinocytes and Langerhans cells with dendritic epidermal T cells. 1996. *Semin Immunol*, 8 (6): 333-9.
- THATCHER, V.; EISENMANN, C.; HERTING, M. Experimental inoculation of Panamanian mammals with *Leishmania braziliensis*. 1965. *J Parasitol*, 51 (5): 842-4.
- THEODOS, C.; RIBEIRO, J.; TITUS, R. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. 1991. *Infect Immun*, 59 (5): 1592-8.

- THEODOS, C. & TITUS, R. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophages function *in vitro*. 1993. *Parasite Immunol*, 15 (8): 481-7.
- THIAKAKI, M.; ROHOSOUVA, I.; VOLFOVA, V.; VOLF.; P.; CHANG, K.; SOTERIADOU, K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. 2005. *Microbes Infect*, 7: 760-766.
- TITUS, R.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. 1985. *Parasite Immunol*, 7: 545-555.
- TITUS, R. & RIBEIRO, J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. 1988. *Science*, 239 (4845): 1306-8.
- TOPRAK, S. & OZER, N. Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey. 2005. *Med Vet Entomol*, 19 (1): 107-10.
- TRAVI, B.; REY-LADINO, J.; SARAVIDA, N. Behavior of *Leishmania braziliensis* in golden hamster: evolution of the infection under different experimental conditions. 1988. *J Parasitol*, 74 (6): 1059-62.
- TRAVI, B.; OSORIO, Y.; MELBY, P.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIDA, N. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. 2002. *Infect Immunity*, 70 (5): 2288-2296.
- VALENZUELA, J.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.; RIBEIRO, J. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. 2001. *J Exp Med*, 194 (3): 331-42.
- VOLF, P. & ROHOUSOVÁ, I. Species-specific antigen in salivary glands of phlebotomine sandflies. 2001. *Parasitology*, 122: 37-41.
- VOULDOUKIS, I.; ISSALY, F.; FOURCADE, C.; PAUL-EUGENE, N.; AROCK, M.; KOLB, J.; DA SILVA, O.; MONJOUR, L.; POINSOT, H.; TSELENTIS, Y. CD23 and IgE

expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. 1994. *Res Immunol*, 145 (1): 17-27.

VON STEBUT, E.; METZ, M.; MILON, G.; KNOP, J.; MAURER, M. Early macrophages influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF alpha. 2003. *Blood*, 101 (1): 210-5.

WAHBA, M. & RIERA, C. Salivary gland composition of some Old World vector sand fly. 2006. *J Egypt Soc Parasitol*, 36 (1): 289-96.

WAITUMBI, J. & WARBURG, A. *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. 1998. *Infect Immun*, 66 (4): 1534-7.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.; TITUS, R.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. 1994. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 345 (1312): 223-30.

WHO – World Health Organization (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>)

WILSON, H.; DIECHMANN, B.; CHILDS, G. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infection in golden hamsters. 1979. *Exp Parasitol*, 47 (2): 270-83.

WILSON, H. & LOLLINI, L. *Leishmania braziliensis braziliensis*: metastatic infection in a golden hamster. 1980. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74 (6): 833.