



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Avaliação da eficácia da vacinação intranasal com antígenos totais de *Leishmania* e dos perfis imunopatogênicos associados às infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado**

**LUZINEI DA SILVA COUTO**

Rio de Janeiro  
Abril 2019



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**LUZINEI DA SILVA COUTO**

**Avaliação da eficácia da vacinação intranasal com antígenos totais de *Leishmania* e dos perfis imunopatogênicos associados às infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Eduardo Fonseca Pinto

Rio de Janeiro

Abril 2019

Couto, Luzinei da Silva.

Avaliação da eficácia da vacinação intranasal com antígenos totais de *Leishmania* e dos perfis imunopatogênicos associados às infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado / Luzinei da Silva Couto. - Rio de Janeiro, 2019.

xii, 88f f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: Eduardo Fonseca Pinto.

Bibliografia: f. 77-88

1. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 3. hamster dourado. 4. imunopatogênese. 5. vacinação intranasal. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**LUZINEI DA SILVA COUTO**

**Avaliação da eficácia da vacinação intranasal com antígenos totais de *Leishmania* e dos perfis imunopatogênicos associados às infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado**

Orientador: Eduardo Fonseca Pinto

Aprovado em: 16/04/2019

Examinadores:

**Dr.** Renato Porrozzi de Almeida – Membro  
**Dra.** Bartira Rossi Bergmann – Membro  
**Dra.** Flávia Lima Ribeiro Gomes – Membro  
**Dr.** Herbert Leonel de Matos Guedes – Membro  
**Dra** Katia da Silva Calabrese – Membro  
**Dr.** Adriano Gomes Silva – 1º Suplente/revisor  
**Dra.** Silvia Amaral Gonçalves da Silva – 2º Suplente

Rio de Janeiro, 16 de Abril de 2019.

A Deus, aos meus pais, irmãos, minha esposa Daiana e à minha filha Helena que me deram forças para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste de lamento em veste de alegria, para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale. Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.

Salmos 30:11-12

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado força e sabedoria para alcançar mais uma etapa em minha vida, ao lado uma grande família, a família LIPMED.

Aos meus pais que com a graça de Deus, foram sábios em minha criação, mostrando que na vida tudo é possível para aqueles que amam a Deus. Pai e mãe eu amo vocês.

À minha esposa Daiana Hardoim, por todo companheirismo ao longo destes anos me dando forças para não desistir e nos presenteando com nosso lindo baby.

Ao Dr. Eduardo Fonseca Pinto, por não medir esforços para acompanhar todas as etapas deste longo caminho. Obrigado por todos os ensinamentos e parceria ao longo destes 10 anos.

À Dra. Alda Maria da Cruz, por me permitir fazer parte de sua equipe, contribuindo em todas as etapas ao longo desta caminhada.

Ao Dr. Adriano Gomes, pela imensa contribuição nos trabalhos desenvolvidos tanto na bancada como na parte intelectual. Obrigado por tudo, amigo!

À minha amiga Dra. Joanna Reis. Obrigado por tudo que convivemos durante esses anos!

À Dra. Raquel Peralva, e a doutoranda Andrea Saavedra, pelo apoio em todos os experimentos, em especial o RT qPCR. Aos demais integrantes do LIPMED que nunca mediram esforços para me ajudar, Rosa Plácido, Maria Fantinatti, Maria Luciana, Samyra Almeida, Clébio Eleotério, Tayany de Deus e a todos os alunos de iniciação científica que passaram um período no LIPMED.

Aos integrantes do biotério do pavilhão Carlos Chagas, que nos apoiaram cuidando dos os animais.

Às agências de fomentos CAPES, FAPERJ e ao CNPQ.

À FIOCRUZ por permitir a realização deste projeto em suas instalações.

À pós-graduação em Medicina Tropical por me inserir em seu quadro de discente e me acrescentar um vasto conhecimento na área da ciência.

Aos doutores que aceitaram compor a banca para avaliar esta tese sou eternamente grato e me sinto honrado por ser avaliado por pessoas tão renomadas no meio científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível vel Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	XIii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses – As doenças.....	1
1.2. Métodos de controle da LTA.....	3
1.2.1. O tratamento .....	4
1.2.2. Vacinação contra <i>Leishmania</i> spp.....	5
1.3. Imunização por via de mucosa .....	8
1.4. Resposta imune na LTA .....	10
1.5. Modelo experimental na LTA .....	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	17
Objetivo Geral .....	17
Objetivos específicos .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Animais .....	18
4.2. Parasitos.....	18
4.3. Antígeno vacinal .....	18
4.4. Imunização e infecção .....	19
4.5. Avaliação da eficácia vacinal.....	19
4.6. Avaliação da resposta imune.....	20
4.6.1. Quantificação de imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i> .....	20
4.6.2. Expressão gênica por RT qPCR .....	21
4.7. Análise estatística.....	24
5. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA	25
6. RESULTADOS	27



<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FML	Ligante de fucose e manose
IFN- $\gamma$	Interferon - gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
kDa	Kilodaltons
LaAg	Antígeno total de <i>Leishmania amazonensis</i>
LACK DNA	DNA plasmidial com o gene que codifica a proteína LACK
LC	Leishmaniose cutânea
LDA	Ensaio de diluição limitante
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RACK	Receptores de Proteína Quinase C Ativada
RTqPCR	Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Células T helper subtipo 1
Th2	Células T helper subtipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral

## RESUMO

Estudos anteriores de vacinação no modelo murino demonstraram a eficácia da mucosa nasal na liberação efetiva de antígenos totais de *L. (L.) amazonensis* (LaAg) para gerar proteção contra a infecção por *L. amazonensis*. Como a maioria das cepas de camundongos é resistente à infecção pelas espécies do subgênero *Viannia*, responsáveis pela maioria dos casos de leishmaniose tegumentar nas Américas (LTA), nosso grupo tem trabalhado na padronização do modelo hamster dourado para estudos de vacinas e patogênese, sobretudo na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Estudos de imunoproteção demonstraram a eficácia do LaAg, administrado por via intranasal (IN) contra infecção por *L. braziliensis*. Neste trabalho, buscamos investigar, no modelo hamster, a eficácia protetora e a resposta imune associada à vacinação IN e intramuscular (IM) com LaAg frente à infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e avaliou-se perfis imunopatogênicos associados à infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Para isso, hamsters foram imunizados com duas doses de 20 µg de LaAg por via IN (LaAg IN) ou por via IM (LaAg IM), e desafiados na pata com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. O grupo controle foi infectado, mas não vacinado. Após 5, 30, 50 e 100 dias após infecção foi realizada a quantificação da carga parasitária, a dosagem de IgG total e IgG2 anti-*Leishmania* e a avaliação da expressão de RNAm de enzimas e citocinas por RTqPCR. Os resultados dos ensaios de eficácia vacinal demonstraram que, ao comparar com o grupo controle (não vacinado), o grupo LaAg IN apresentou uma redução significativa no crescimento da lesão e na carga parasitária dos hamsters infectados por *L. amazonensis*, enquanto que o grupo LaAg IM apresentou uma exacerbação da lesão. No 100º dia da infecção, o grupo LaAg IM apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da expressão de iNOS (*fold change*=22) comparado com o grupo LaAg IN (98) e comparado com o grupo controle, um aumento na expressão de Arginase (LaAg IM=131 x controle=80), IL-10 (LaAg IM=3,4 x controle=2) e IL-4 (LaAg IM= 3,3 x controle= 0,74) nas patas infectadas. A maior expressão gênica de iNOS aos 50 dias nos animais do grupo LaAg IN comparados aos grupos controle e LaAg IM, pode ser um indicativo indireto de resposta imune associada a proteção na infecção por *L. amazonensis*. No estudo de imunopatogênese, as lesões dos hamsters infectados por *L. amazonensis* eram nodulares, não ulceradas e significativamente menores (1,75mm) do que as lesões daqueles infectados por *L. braziliensis* (2,35mm), que eram ulceradas e com visível dano tecidual. Por outro lado, a carga parasitária na pata ( $7,4 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido) e no linfonodo ( $2,6 \times 10^6$ ) no grupo infectado por *L. amazonensis* foi maior que no grupo infectado por *L. braziliensis* (pata= $9,0 \times 10^4$  e linfonodo= $2,0 \times 10^4$ ). Os níveis de IgG e principalmente IgG2 anti-*Leishmania* do grupo infectado por *L. amazonensis* foram maiores que o observado no grupo infectado por *L. braziliensis*. Além disso, foi observado um aumento significativo da expressão de iNOS, IFN- $\gamma$  e TNF na pata dos hamsters infectados por *L. braziliensis* enquanto que naqueles infectados por *L. amazonensis* foi observado um aumento de expressão de arginase. Estes resultados demonstraram que a vacinação IN com LaAg induz proteção contra diferentes espécies de *Leishmania* relacionadas a LTA (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) no mesmo modelo experimental, o modelo hamster, indicando que a vacinação IN usando LaAg é altamente promissora no desenvolvimento de uma vacina humana eficaz contra as leishmanioses. Além disso, foi demonstrado que os hamsters infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* reproduziram importantes aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos observados na doença humana. Este trabalho confirma que o modelo hamster pode ser um modelo de estudo apropriado para estudos de imunoproteção e imunopatogênese da LTA.

## ABSTRACT

Previous studies of vaccination in the murine model demonstrated the efficacy of the nasal mucosa in the effective release of total antigens of *L. (L.) amazonensis* (LaAg) to generate protection against infection by *L. amazonensis*. Since most strains of mice are resistant to infection by species of the subgenus *Viannia*, which are responsible for most cases of cutaneous leishmaniasis in the Americas (ACL), our group has been working on the standardization of the golden hamster model for vaccine studies and pathogenesis, especially for *L. (V.) braziliensis* infection. Immunoprotective studies have demonstrated the efficacy of LaAg administered intranasally (IN) against infection by *L. braziliensis*. In this work, we investigated, in the hamster model the protective efficacy and immune response associated with IN and intramuscular (IM) vaccination with LaAg against *L. amazonensis* and *L. braziliensis* infection and evaluated the immunopathogenic profiles associated with *L. amazonensis* or *L. braziliensis* infection. For this, hamsters were immunized with two doses of 20 µg of LaAg by the IN (LaAg IN) or IM (LaAg IM) route and challenged in the paw with  $1 \times 10^5$  promastigotes of *L. braziliensis* or *L. amazonensis*. The control group was infected but not vaccinated. After 5, 30, 50 and 100 days of infection the quantification of the parasite load, total IgG and anti-*Leishmania* IgG2, and the evaluation of the mRNA expression of enzymes and cytokines by RT qPCR were performed. The results of the vaccine efficacy trials demonstrated that the LaAg IN group showed a significant reduction in lesion growth and parasite load of *L. amazonensis* infected hamsters when compared to the control group (unvaccinated), whereas the LaAg group IM presented an exacerbation of the lesion. On the 100th day of infection, the LaAg IM group showed a significant decrease ( $p < 0.01$ ) in the iNOS expression (fold change = 22) compared to the LaAg IN group (98) and an increase in expression of Arginase (LaAg IM = 131 x control = 80), IL-10 (LaAg IM = 3.4 x control = 2) and IL-4 (LaAg IM = 3.3 x control = 0.74) on infected paws, compared to the control group. The highest gene expression of iNOS at 50 days in the animals of the LaAg IN group compared to the control and LaAg IM groups may be an indirect indicative of immune response associated with protection in *L. amazonensis* infection. In the study of immunopathogenesis, the lesions of *L. amazonensis* infected hamsters were nodular, non-ulcerated and significantly smaller (1.75mm) than those infected by *L. braziliensis* (2.35mm), which were ulcerated and with visible tissue damage. On the other hand, parasite load on the paw ( $7.4 \times 10^7$  parasites/gram of tissue) and on the lymphnode ( $2.6 \times 10^6$ ) in the *L. amazonensis* infected group were higher than in the group infected by *L. braziliensis* (paw =  $9.0 \times 10^4$  and lymph node =  $2.0 \times 10^4$ ). The levels of IgG and mainly IgG2 anti-*Leishmania* from the group infected by *L. amazonensis* were higher than that observed in the group infected by *L. braziliensis*. Also, a significant increase in the expression of iNOS, IFN- $\gamma$  and TNF was observed in the paw of *L. braziliensis* infected hamsters whereas, in those infected by *L. amazonensis* an increase in the arginase expression was observed. These results demonstrated that IN vaccination with LaAg induces protection against different ACL-related *Leishmania* species (*L. amazonensis* and *L. braziliensis*) in the same experimental model, the hamster model, indicating that IN vaccination using LaAg is highly promising in the development of an effective human vaccine against leishmaniasis. In addition, it was demonstrated that hamsters infected by *L. amazonensis* and *L. braziliensis* have reproduced important clinical, parasitological and immunological aspects observed in human disease. This work confirmed that the hamster model may be an appropriate model for immunoprotective and immunopathogenesis studies for ACL.

# 1. Introdução

## 1.1 Leishmanioses – As doenças

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, transmitida a animais e ao homem por fêmeas de vetores dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo). Somente as fêmeas de flebotomíneos infectadas são capazes de transmitir os parasitos, pois elas se alimentam e necessitam de sangue para o desenvolvimento de seus ovos. O vetor se torna portador da *Leishmania* quando ingerem sangue e linfa de um animal ou uma pessoa infectada. Os principais hospedeiros da *Leishmania* são animais vertebrados incluindo cães, gatos e equinos domésticos, assim como gambás, raposa-do-mato, os animais edentados (exemplo: tamanduá e preguiças) e humanos (Quinnell & Courtenay, 2009; Stockdale & Newton 2013; Brasil, 2017; Ferreira *et al.* 2018).

O parasito se apresenta de duas formas diferentes, uma no hospedeiro invertebrado, a forma promastigota, e a outra em hospedeiro vertebrado, a forma amastigota. A forma amastigota é arredondada ou oval, possui um pequeno flagelo interiorizado, tendo sua multiplicação no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, já a forma promastigota é alongada, possui flagelo exteriorizado e vive no tubo digestivo de inseto flebotomíneos, assim como, em meios de cultura axênicos (Rey, 2008).

Durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o inseto ingere macrófagos e monócitos contendo formas amastigotas do parasito. Essas amastigotas são liberadas no interior do tubo digestivo do inseto, e no epitélio intestinal se diferenciam em formas flageladas chamadas promastigotas procíclicas. Essas, por sua vez, se dividem sofrendo um processo de metaciclogênese, adquirindo virulência e transformando-se em formas promastigotas metacíclicas. Essas formas do parasito se destacam do epitélio, migrando para cavidade bucal do inseto e durante o próximo repasto, essas formas infectivas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado (Cunningham, 2002; Rey, 2008).

Uma vez em contato com o hospedeiro vertebrado, o parasito induz a formação de um processo inflamatório que nas primeiras horas é constituído por células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (Solbach & Laskay 2000).

Embora a incubação de *L. major* com neutrófilos, tenha mostrado a incapacidade desse tipo celular em matar o parasito, essa célula apresenta um papel fagocítico, funcionando como um hospedeiro temporário (Van Zandbergen *et al.* 2004). Os neutrófilos apresentam pouca longevidade, porém, o processo normal de apoptose é retardado pela presença de *Leishmania* viva no interior desta célula (Aga *et al.* 2002).

A leishmaniose é uma doença com múltiplas formas de apresentação clínica, cuja expressão depende de fatores inerentes à resposta imune do hospedeiro, ao agente etiológico e ao vetor envolvido na transmissão. Baseada em aspectos clínicos e evolutivos, a doença pode ser classificada em dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) ou calazar.

Na LV, a mais grave forma clínica da doença, os sinais e sintomas clínicos caracterizam-se por hepatoesplenomegalia, com baço e fígado palpável, febre, perda de massa muscular, anemia, leucopenia, perda de peso, hemorragia nas mucosas. Além disso, na LV ocorre um processo de imunossupressão que pode ocasionar complicações de natureza infecciosa bacteriana, como por exemplo: otite média aguda, piodermites, infecções dos tratos urinário e respiratório, que podem evoluir para um quadro de sepse, podendo levar o indivíduo ao óbito quando não tratada (Brasil, 2017; Faleiro *et al.* 2014).

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar é conhecida como leishmaniose tegumentar Americana (LTA). No Brasil, a LTA é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, sendo que as espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* são as mais frequentemente associadas à doença humana (Coutinho *et al.* 1987; revisto por Da-Cruz & Pirmez 2012). Estas espécies são responsáveis pela forma clínica mais frequente da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LC). Esta forma clínica geralmente é indolor, caracterizada por lesões na pele, em geral autolimitada, com borda elevada e fundo granuloso limpo ou com secreção, em moldura acompanhada ou não de linfadenopatia local, podendo evoluir para a cura espontânea em 50% dos casos, mas que pode evoluir para uma doença crônica e progressiva, deixando cicatrizes permanentes, que podem ter importância sob o aspecto psicossocial do paciente (Murray *et al.* 2005; Da-Cruz & Pirmez, 2012).

Fatores dependente da espécie infectante e da resposta imunológica do hospedeiro podem desencadear outras formas clínicas da doença. Na LC relacionada a *L. braziliensis*, cerca de 3% a 5% dos indivíduos tendem a evoluir para

a leishmaniose mucosa (LM) que afeta a mucosa nasal, oral e da faringe, produzindo uma doença muitas das vezes incapacitante. A LM é curiosamente caracterizada por baixo número de parasitas no local das lesões e alta resposta imune celular que resulta na destruição tecidual observada (Desjeux, 2004; Da-Cruz & Pirmez, 2012).

Outra forma clínica derivada é a leishmaniose cutânea difusa (LCD). No Brasil, a LCD está associada principalmente à *L. amazonensis* e é caracterizada por lesões cutâneas múltiplas, não ulceradas, contendo alto número de parasitos e baixa ou inexistente resposta imune celular específica ao parasito (Brasil, 2017). A resposta à terapêutica com antimoniais é bem mais difícil que nas outras formas clínicas e as recidivas são frequentes (Lainson, 1983; Brasil, 2017).

Dados da literatura demonstraram que a leishmaniose está presente em 98 países nos cinco continentes, com uma taxa de incidência anual de mais de 58.000 casos de LV e 220.000 casos de LT. No entanto, apenas cerca de dois terços dos países relataram dados de incidência por um período de cinco anos. Sendo assim, foi gerada uma estimativa de incidência anual de leishmaniose de 0,2 a 0,4 milhões de casos de da forma visceral e 0,7 a 1,2 milhões de casos da forma tegumentar (Alvar *et al.* 2012).

O Brasil é um país de grande importância epidemiológica, pois se apresenta entre os seis países responsáveis por 90% dos casos de LV no cenário mundial e entre os dez países responsáveis por 75% dos casos de LT (Alvar *et al.* 2012). Estas colocações mostram que o Brasil ocupa posição ímpar, pois é endêmico para ambas as formas, tegumentar e visceral, com uma média anual de 25 mil casos de LT notificados nos últimos 20 anos e aproximadamente 3,1 mil casos de LV nos últimos 10 anos. (Brasil, 2014; Brasil, 2017).

Dados da literatura mostram que no Estado da Bahia os hábitos ocupacionais e domésticos de indivíduos, envolvendo trabalho em fazendas e casas construídas em clareiras na floresta, aumentaram a exposição da população à infecção por *L. braziliensis* com registros de 7.093 casos de LTA na região de 2007 a 2012, destes 6.747 (95%) foram casos de LC, 138 (2%) casos de LM e 208 casos (3%) casos de LCD (Castelluci *et al.* 2014).

## **1.2. Métodos de controle da LTA**

Os métodos de controle da doença como a eliminação dos hospedeiros reservatórios e do vetor flebotomíneo, são operacionalmente difíceis devido à

natureza predominantemente silvestre de ambos, ou então por envolver canídeos de estimação. Atualmente, as medidas de controle são a detecção precoce da doença e seu tratamento por quimioterapia.

### 1.2.1. O tratamento

O tratamento de primeira escolha recomendado pelo Ministério da Saúde para qualquer forma de leishmaniose ainda se baseia nas séries de injeções intramusculares com antimoniais pentavalentes. Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia, havendo dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina (ex.: Glucantime®) e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (Brasil, 2017).

Inicialmente, pode haver uma resposta ao antimonial, porém são frequentes as recidivas, sendo necessário reencaminhar o paciente para serviços de saúde. Por ser um tratamento doloroso e exigir a visita do paciente à unidade de saúde por vários dias, muitos pacientes abandonam o tratamento. Estes fatos, juntamente com o surgimento de cepas de *L. tropica*, *L. donovani* e *L. braziliensis* resistentes aos antimoniais colaboram para o insucesso terapêutico do tratamento (Schriefer *et al.* 2008). Além desses fatores negativos ao tratamento, os antimoniais são extremamente tóxicos para o fígado, rins e coração.

As drogas de segunda escolha que estão disponíveis no mercado são: Anfotericina B disponível como (desoxicolato sódico de anfotericina B e na formulação lipossomal) e a pentamidina. Entretanto, a anfotericina B também apresenta uma série de efeitos colaterais como, hipopotassemia, flebite no local da infusão, anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas, além do alto custo (anfotericina B lipossomal). Já os efeitos colaterais mais observados no uso da pentamidina são: anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal, pancreatite e diabetes (Brasil, 2017).

Diante deste quadro, é imprescindível a busca por novos fármacos para o tratamento da doença e também de uma vacina que possa induzir resposta imune protetora contra o protozoário.



### 1.2.2. Vacinação contra *Leishmania* spp.

Embora a forma mais eficaz de controlar a doença seja através da imunoprofilaxia e apesar dos esforços despendidos nas últimas 3 décadas, até o momento ainda não se dispõe de nenhuma vacina aprovada para uso humano (Kedziersk *et al.* 2006, Kedziersk *et al.* 2010).

Na tentativa de controlar a leishmaniose, alguns países fizeram uso de um procedimento denominado leishmanização (Nagill & Kaur, 2011). Este método envolve a inoculação de *L. major* viva no indivíduo, causando uma lesão similar a uma infecção natural, mas com a lesão localizada em um local pré-determinado evitando assim as lesões de face. Após a cura, os indivíduos estavam protegidos contra a infecção natural. Nestes países, este processo foi demonstrado ser a medida mais eficaz no controle da leishmaniose cutânea (Davoudi *et al.* 2014). Entretanto, este método foi interrompido devido a uma série de razões incluindo controle de qualidade, a persistência parasitária, desenvolvimento de lesões, exacerbação de psoríase, assim como outras doenças de pele, o surgimento do HIV e razões éticas. Tais restrições fizeram com que seu uso fosse restrito a Uzbequistão e a ensaios de eficácia em humanos no Irã (Kedziersk *et al.* 2010, Nagill & Kaur, 2011; Silva *et al.* 2013).

A ocorrência de uma resposta imune protetora, mesmo que parcial, pôde ser observada a partir da leishmanização, também, nos casos de cura espontânea em muitos pacientes com a forma cutânea. Essas evidências são a base para os estudos que buscam uma vacina capaz de induzir uma resposta protetora contra a leishmaniose.

Com inúmeros candidatos vacinais estudados, as vacinas são classificadas como vacinas de primeira, segunda e terceira geração.

As vacinas de primeira geração são compostas de parasitos mortos e parasitos vivos atenuados.

Dentre as vacinas de primeira geração composta por lisado total de parasitos para uso em humanos, uma das mais estudadas é a vacina produzida no Brasil pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink a partir da década de 70. Primeiramente esta vacina era composta por um *pool* de antígenos de cinco espécies de *Leishmania* diferentes (Mayrink *et al.* 1979), sendo mais tarde aprimorada com apenas antígenos de *L. amazonensis*, a vacina denominada Leishvacin<sup>®</sup> que se mostrou segura e imunogênica nos estudos de fase I e de fase II (Marzochi *et al.*

1998, De Luca *et al.* 1999). Porém, em um ensaio de eficácia realizado na Colômbia, não conferiu proteção em indivíduos expostos a infecção por *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Vélez *et al.* 2005). Entretanto, a Leishvacin® foi efetiva em reduzir a dose do antimonial necessária para atingir a cura, sendo administrada junto com a terapia com antimonial no Brasil, mas não como medida profilática (Khamesipour *et al.* 2006).

Dentre as vacinas com parasitos vivos geneticamente atenuados estão a *Leishmania major* knock-out para a diidroredutase-timidilato sintase (DHFR-TS) que induz proteção em camundongos, mas não em primatas (Veras *et al.* 1999; Amaral *et al.* 2002), a *L. mexicana* knock-outs para os genes *cpa* e *cpb* de cisteína proteases que conferiram proteção em camundongos e hamsters contra a infecção com *L. mexicana* (Alexander *et al.* 1998, Saravia *et al.* 2006), ou ainda a vacinação fotodinâmica com *L. amazonensis* transfectadas com genes suicidas induzíveis (Kumari *et al.* 2009). Apesar de bastante interessantes em termos de proteção, os parasitos geneticamente modificados vivos apresentam limitações de aplicabilidade e segurança.

As vacinas de segunda geração podem ser divididas de acordo com a sua composição em 4 categorias: subunidades definidas, proteínas recombinantes, frações brutas e vacinas vetorizadas.

Entre as vacinas com subunidades definidas destacam-se os estudos com o antígeno gp63, uma proteína conservada e abundante na superfície celular da *Leishmania* (Russo *et al.* 1991). Outra proteína bastante estudada é a proteína LACK de 36 kDa e 312 aminoácidos, que recebeu esse nome por apresentar homologia com as proteínas RACK (Receptores de Proteína Quinase C Ativada) de mamíferos. Ela é altamente conservada entre espécies de *Leishmania* e é expressa tanto na forma promastigota como na forma amastigota do parasito (Mougneau *et al.* 1995). A susceptibilidade murina à infecção com *L. major* foi correlacionada com a polarização de células Th2 parasito-específicas, sendo o antígeno LACK o principal responsável pela expansão dessas células, por ativar T CD4<sup>+</sup> que expressam TCR V4α/Vβ8 produtores de IL-4 que se expandem rapidamente após a infecção (Launois *et al.* 1997). A proteína LACK, também denominada p36, foi capaz de conferir proteção contra *L. major* em camundongos BALB/c somente quando administrada com IL-12 (Gurunathan *et al.* 1997). Ainda entre as vacinais de subunidade está a proteína A2, um antígeno presente na forma amastigota de *Leishmania*, que está comercializada como vacina canina denominada Leish-Tec® pela HertapeCalier

(Fernandes *et al.* 2008) e que recentemente apresentou capacidade de induzir imunidade protetora em primatas não humanos (Grimaldi *et al.* 2014). Recentemente, uma proteína purificada de *L. donovani* denominada LdNH36, mostrou ser capaz de induzir um aumento em células produtoras de IFN-  $\gamma$  , com diminuição da carga parasitária no modelo murino de infecção com *L. mexicana* (McAtee *et al.* 2017).

A primeira vacina de segunda geração utilizada em ensaios clínicos de fase I e II foi a vacina recombinante LEISH-F1, composta pela proteína antioxidante tiol-específica homóloga de *L. major* (TSA), pela proteína 1 stress-induzível de *L. major* (LmSTI1) e pelo fator de iniciação e alongamento de *L. braziliensis* (LeIF) associada ao adjuvante monofosforil-lípido A e esqualeno (MPL-SE) (IDRI, Seattle, WA). Esta vacina se mostrou segura e imunogênica (Chakravarty, J. *et al.* 2011). A partir dos resultados com a vacina LEISH-F1, foi construída a vacina LEISH-F2 que apresentava algumas modificações estruturais e foi avaliada em estudos de fase I e II. Posteriormente a vacina denominada LEISH-F3, composta pela proteína nucleosídeo-hidrolase (NH) de *Leishmania infantum / donovani* e pelos resíduos 2-353 da proteína esterol 24-c-metiltransferase (SMT) de *Leishmania infantum* em associação com o adjuvante glucopiranosil lípido (GLA-SE) foi avaliada em um ensaio de fase I de voluntários adultos saudáveis visando seu uso futuro contra LV.

Entre as frações brutas, o FML, ligante de fucose e manose de *L. donovani* é dito como protetor na LV, levando à redução da carga parasitária e de sinais clínicos da doença em cães (Borja-Cabrera *et al.* 2010) e foi comercializada, com o nome de Leishmune® pela FortDodge para aplicação veterinária contra LV.

Podemos destacar também as vacinas vetorizadas, que consiste na utilização de vírus ou bactérias recombinantes como vetores vivos, expressando antígenos do parasito. A imunização com organismos vivos sabidamente induz uma resposta celular mais intensa e eficiente do que a induzida por antígenos mortos e purificados, o que é uma característica significativa quando se busca uma vacina contra um parasito intracelular. Entretanto, poucos antígenos de *Leishmania* já foram clonados seguindo essa estratégia, alguns em bactérias como BCG (Connell *et al.* 1993; Abdelhak *et al.* 1995; Streit *et al.* 2000) e *Salmonella* (Yang *et al.* 1990; Xu *et al.* 1995) e outros em alguns vetores virais (McMahon-Pratt *et al.* 1993; Ramos *et al.* 2008).

As vacinas de terceira geração são as chamadas vacinas de DNA, nos quais genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são inseridos em

plasmídeos. Tais vacinas são capazes de induzir resposta imune humoral e celular e que podem ter uma modulação aumentada pela adição de citocinas e/ou Oligodeoxinucleotídeo (CpG ODN) (Gurunathan *et al.* 2000). As vacinas de DNA mais bem estudadas foram as previamente testadas como proteínas recombinantes (Nagill & Kaur, 2011).

As vantagens das vacinas de DNA são a sua capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas a das proteínas selvagens, capacidade de gerar respostas humorais e celulares mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única (Costa Souza 2011).

Em termos de vacina de DNA, uma das vacinas mais estudadas até agora contra LC e LV é a vacina contendo o gene que codifica a proteína LACK. A imunização intramuscular de camundongos com LACK DNA induziu proteção parcial contra infecção por *L. major* em camundongos BALB/c (Gurunathan *et al.* 1997), mas não protegeu camundongos BALB/c contra infecção por *L. mexicana* (Dumonteil *et al.* 2003), *L. donovani* (Melby *et al.* 2001), *L. chagasi* (Marques-da-Silva *et al.* 2005) e *L. braziliensis* (Salay *et al.* 2007). Recentemente, um estudo utilizando genes específicos para Fator de Iniciação eucariótica de *Leishmania* (LeIF), apresentou uma proteção parcial contra a infecção com *L. major* em camundongos BALB/c (Maspi *et al.* 2017)

### **1.3. Imunização por via de mucosa**

A despeito de ser a via de administração de vacina mais utilizada, a via parenteral não é a via usual de entrada da maioria dos patógenos contra os quais a vacinação é dirigida, uma vez que a maioria dos vírus e bactérias que causam doenças entra em contato com o corpo através de superfícies mucosas (Pinto *et al.* 2011; Fortuna *et al.* 2014).

A via de mucosa se apresenta como uma opção bastante atraente, sendo considerado um dos maiores órgãos do corpo revestindo os tratos gastrointestinal, respiratório inferior e superior, e o trato urogenital, além do mais, dados da literatura mostrou que antígenos administrados por esta via, podem induzir uma resposta imune a nível sistêmico ou suprimir respostas imunológicas indesejáveis como ocorre em doenças auto-imunes e alérgicas (Winkler *et al.* 2002; Neutra & Kozlowski, 2006). Além disso, as vacinas de mucosa, diferentemente das injetáveis, não requerem esterilização rigorosa em seu preparo, o que reduz seu custo, e por

ser um método não invasivo, sua administração é mais viável e facilita a adesão pela população, o que facilitaria uma campanha de vacinação de ampla cobertura (Chen & Cerutti, 2010).

Dentre as via de mucosa, a via intranasal fornece um eficiente meio de imunização, por ser de fácil acesso, possuir alta vascularização e numerosas microvilosidades recobrando o epitélio, o que gera uma grande superfície de absorção. Ela pode induzir respostas imunes locais e sistêmicas, pode ser utilizada para imunização de grandes grupos populacionais além de requerer menor quantidade de material, diminuindo os custos da vacinação. Além disso, não requer agulhas e seringas (que são fontes potenciais de infecção e requerem pessoal especializado), é uma via não invasiva e garante uma maior estabilidade do Ag administrado, uma vez que a degradação é menor do que pela via oral.

A captação de antígenos por via nasal pode resultar em tolerância periférica, no entanto, dados da literatura relatam que é capaz de gerar uma imunidade sistêmica através da administração de antígenos através da mucosa (Bakke *et al.* 2001) e o equilíbrio entre tolerância e imunidade é uma função da natureza, da dose, da forma do antígeno (solúvel ou particulado), do sítio de administração e da associação com adjuvantes (Makala *et al.* 2004).

Nos estudos anteriores de utilização de vacinas por via de mucosa contra leishmaniose utilizando o modelo murino, foi demonstrado que enquanto o antígeno bruto (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis* – LaAg), quando administrado por via parenteral (subcutânea ou intramuscular), promoveu agravamento da lesão pós infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003; Pinheiro *et al.* 2005), quando este mesmo candidato vacinal foi administrado pelas vias de mucosa oral e nasal, foi demonstrada de forma inédita a eficácia do uso de vias não injetáveis na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2003; Pinto *et al.* 2004; Pratti *et al.* 2016).

Adicionalmente, foi demonstrado que a imunização intranasal com o DNA plasmidial codificando o antígeno LACK (LACK DNA) também protege camundongos contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2004) e por *L. infantum* (Gomes *et al.* 2007). Tal proteção foi observada em animais desafiados tanto com 7 dias quanto com 3 meses após a imunização (De Oliveira Gomes *et al.* 2012), o que reforça o potencial da mucosa nasal como uma via estratégica de vacinação contra a leishmaniose.

#### 1.4. Resposta imune na LTA

O sistema imune do hospedeiro contribui para controlar a infecção por *Leishmania*, principalmente através da resposta celular. Os momentos iniciais de infecção do hospedeiro por formas promastigotas de *Leishmania* são importantes para a sobrevivência do patógeno.

Os neutrófilos participam das respostas iniciais com importante capacidade de fagocitose e destruição de formas parasitárias. No entanto, em situações favoráveis ao parasito, mecanismos de evasão dependente dos neutrófilos também podem contribuir para a perpetuação da *Leishmania*, visto que a fagocitose dessas células infectadas impede a ativação dos macrófagos, possibilitando a entrada e a proliferação do patógeno em células hospedeiras definitivas (Laskay *et al.* 2003, Ritter *et al.* 2009)

Após algumas horas de infecção, o infiltrado inflamatório passa a ser formado predominantemente por macrófagos, que irão fagocitar os neutrófilos apoptóticos, sendo essa uma via alternativa de entrada da *Leishmania* no macrófago. As interações entre estas células impedem a ativação do macrófago e propicia a sobrevivência da *Leishmania* no interior do mesmo, mostrando assim que os neutrófilos desempenham um papel de “Cavalo de Tróia” na infecção (van Zandbergen *et al.* 2004). Dentro do macrófago as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas no fagolisossomo. Sob essa forma, os parasitos proliferam e eventualmente rompem a célula permitindo que os parasitos infectem outras células fagocíticas estabelecendo a infecção (Cunningham, 2002; Goto & Lindoso 2010; Faleiro *et al.* 2014).

Estudos demonstraram que as imunoglobulinas anti-*Leishmania* podem participar de mecanismos de evasão desse parasito, que é favorecido por sua opsonização (Pleass & Woof 2001; Miles *et al.* 2005). Evidências em modelos experimentais com animais deficientes em produzir IgG, também atribuem às Igs, papel de resistência à infecção por *Leishmania* (Kima *et al.* 2000). Por outro lado, verificou-se a importância da fagocitose de formas parasitárias opsonizadas por anticorpos quanto ao direcionamento da via de apresentação de antígenos para linfócitos T. Acredita-se que a concentração de anticorpos complementares aos antígenos de *Leishmania* seja diretamente proporcional à carga parasitária e ao tempo de exposição ao estímulo antigênico (Gutierrez *et al.* 1991).

Dados da literatura mostram a importância da resposta imune mediada por células e seu papel determinante na evolução da LTA. Em estudos realizados em humanos, assim como em animais de experimentação, a imunopatologia das leishmanioses está ligada há uma interação de dois tipos de resposta celular, a resposta imune do tipo 1 (Th1) e a resposta imune do tipo 2 (Th2).

A resposta Th1 tem como característica a predominância das citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que na resposta Th2 a predominância é de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. A resposta Th1 está ligada ao controle do parasitismo pela produção de IFN- $\gamma$  que promove a ativação dos macrófagos através da expressão da enzima iNOS e a consequente produção de óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina. Entretanto, uma resposta Th1 exacerbada contribui para o processo de necrose e destruição dos tecidos do hospedeiro. Por outro lado, citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-5) que possuem funções antagônicas ao perfil Th1, e induzem menor expressão de iNOS, favorecendo a persistência parasitaria dentro dos macrófagos infectados, gerando as formas mais graves associadas a alta carga parasitária (Michel & Feron, 1997; Afonso *et al.* 1993; Berhe *et al.* 1995; Brandonisio *et al.* 2001).

Na LC, há diferenças marcantes no padrão histopatológico e imunológico quando se compara a infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Na LC causada por *L. amazonensis*, a reação inflamatória local se apresenta com um grande número de macrófagos parasitados, como uma elevada expressão de IL-4, e altos títulos de anticorpos específicos. Esse padrão de resposta parece estar ligado a um perfil de resposta anérgico induzido pela infecção de *L. amazonensis*. Na LC causada por *L. braziliensis*, a concentração de macrófagos infectados é menor, porém, apresenta uma alta expressão de IFN- $\gamma$  e títulos de anticorpos menores do que encontrados em pacientes infectados com *L. amazonensis*.

Baseado nestes estudos é possível concluir que a infecção por *L. braziliensis* tende a direcionar a infecção para um polo hiperérgico do espectro clínico-imunológico, associado a uma forte resposta imune do tipo Th1. Já a infecção por *L. amazonensis* mostra o oposto, onde há um direcionamento da infecção para um polo anérgico, tendo como característica uma resposta imune marcante do tipo Th2 (Silveira *et al.* 1998, Silveira *et al.* 2004, Silveira *et al.* 2008).

## 1.5. Modelo experimental na LTA

O uso de modelos animais de pequeno porte para o estudo de doenças infecciosas é fundamental para a compreensão da progressão da doença e para o desenvolvimento de vacinas.

Muito do que se sabe sobre os mecanismos imunopatogênicos e de imunoproteção na leishmaniose foi investigado no modelo camundongo de infecção, sobretudo por *L. major* e também *L. amazonensis*. As cepas BALB/c e C57BL/6 preenchem, respectivamente, um padrão de susceptibilidade e resistência à *L. major* tornando-os interessantes para estudar fenômenos de progressão e controle da infecção (Aguilar-Torrentera *et al.* 2002). Na infecção com *L. amazonensis* não é evidente esta polaridade, uma vez que a maioria das cepas de camundongos desenvolve uma lesão progressiva com graus variados de susceptibilidade.

No entanto, o estudo da infecção por espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*), principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas, é limitado pela dificuldade de modelos experimentais adequados. As cepas de camundongos que se infectam pela *L. braziliensis* desenvolvem um quadro clínico frustrado e de curso benigno, não reproduzindo os aspectos mais característicos da LTA e dificultando estudos em que é necessário o acompanhamento de lesão por longo prazo, como os estudos de avaliação de candidatos vacinais e de novos fármacos (DeKrey *et al.* 1998; De Moura *et al.* 2005, Rocha *et al.* 2007, Soong *et al.* 2012).

Diferentemente do modelo murino, o modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) apresenta alta susceptibilidade a infecção por espécies do subgênero *Viannia*, já que desenvolve lesões cutâneas de curso crônico reproduzindo muitos dos aspectos clínicos e patológicos da leishmaniose cutânea humana, causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Kahl *et al.* 1991; Oliveira *et al.* 2004, Osorio *et al.* 2003; Gomes-Silva *et al.* 2013; Ribeiro-Romão *et al.* 2014; Warner *et al.* 2017).

O uso de hamsters como um modelo experimental aumentou muito nos últimos anos devido à sua capacidade de refletir a progressão de várias doenças humanas, como a sífilis, leishmanioses, doença de Chagas, clostridiose e ancilostomose (Melby *et al.* 1998, Bilate *et al.* 2007, Goulding *et al.* 2009, Mendez *et al.* 2005).



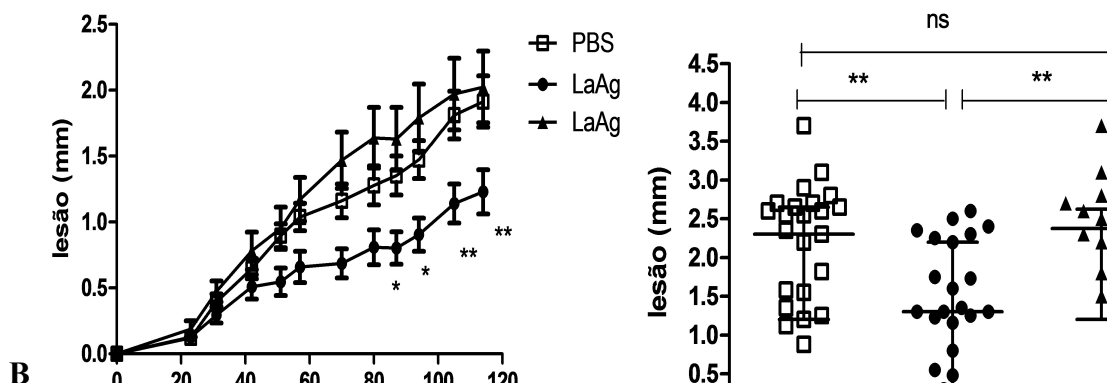
Outro fator importante no uso do modelo hamster, é que este apresenta um *background* genético *outbred* (não consanguíneos). Com as características individuais desses animais decorrentes da variabilidade genética, a não homogeneidade dos parâmetros individuais em muito se assemelha com o que é observado nas doenças humanas (Hommel, *et al.* 1995, Osorio *et al.* 1998; Ribeiro-Romão *et al.* 2014).

Nosso grupo tem estudado nos últimos anos as alterações clínicas e imunopatogênicas durante a evolução da infecção por *L. braziliensis* no hamster dourado, no sentido de se estabelecer parâmetros laboratoriais que permitam utilizar este modelo para o estudo da patogênese e de proteção vacinal na LTA.

Nos estudos da patogênese da LTA no modelo hamster, foi demonstrado que os animais quando infectados com a mesma cepa de *L. braziliensis* reproduzem a infecção em diferentes experimentos. Neste modelo, é possível observar uma lesão de evolução lenta de curso clínico crônico, tornando este um modelo ideal para o acompanhamento dos estudos de novos fármacos, assim como, de candidatos vacinais (Gomes-Silva *et al.* 2013, Ribeiro-Romão. 2013; Da Silva-Couto *et al.* 2015).

Nos estudos de imunoproteção, demonstramos de forma inédita que a eficácia do protótipo vacinal LaAg administrado por via intranasal foi estendida contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* no modelo hamster dourado, acompanhados por até 110 dias após a infecção (Fig.1.1) (Da Silva-Couto *et al.* 2015).

A



**Figura 1.1 – Comparação da eficácia protetora do candidato vacinal LaAg por via intranasal e intramuscular contra a infecção com *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo hamster. A) Morfometria de pata de hamsters imunizados por via intranasal com 10 ug LaAg ou por via intramuscular com 20ug LaAg e desafiados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Controle recebeu PBS. B) Gráfico representa o tamanho da lesão da pata de cada animal dos 4 experimentos independentes no último dia de acompanhamento (114 dias), totalizando 18-27 animais por grupo. \*p < 0,05; \*\* p<0,01 (Da Silva-Couto *et al.* 2015).**

No entanto, a escassez de insumos imunológicos, como por exemplo, anticorpos específicos para citocinas e moléculas marcadoras de subpopulações celulares, importantes no estudo de resposta imune associada a doença ou a proteção, tem limitado a utilização do hamster como modelo experimental (Oliveira *et al.* 2004, De Oliveira Gomes *et al.* 2011, Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

Neste sentido, nosso grupo tem se dedicado à padronização de técnicas moleculares e imunológicas para análise da resposta imune nos animais imunizados e infectados por *L. braziliensis*. Recentemente nosso grupo padronizou um ensaio de PCR em Tempo Real para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR das citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-6, e das enzimas arginase e iNOS, utilizando o sistema SYBR Green<sup>®</sup> de detecção, em pele e linfonodo de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis*. Além disso, como alternativa à utilização de técnicas tradicionais de quantificação da carga parasitária, como a diluição limitante, técnica laboriosa e passível de contaminações que interferem nas análises, também padronizamos a reação de PCR em Tempo Real quantitativa para o alvo kDNA, para quantificar a carga parasitária de *Leishmania*, a partir da mesma amostra de tecido utilizada para análise de expressão gênica (Ribeiro-Romão *et al.* 2016).

A partir dos resultados promissores obtidos com o protótipo vacinal LaAg administrado por uma via não injetável (intranasal) contra a infecção por *L. amazonensis* no modelo murino e contra a infecção cruzada contra a *L. braziliensis* no modelo hamster, propomos, nos estudos de imunoproteção, avaliar se a eficácia protetora da vacinação intranasal com LaAg contra a infecção por *L. amazonensis*, já demonstrada no modelo murino, pode ser estendida ao modelo hamster e caracterizar a modulação da resposta imune induzida pela vacinação intranasal e intramuscular com LaAg nos momentos iniciais e intermediários da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*; e nos estudos de imunopatogênese, comparar as alterações clínicas parasitológicas e imunológicas durante a evolução da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em um mesmo modelo experimental, o modelo hamster.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde, importantes doenças tropicais para saúde pública. A estratégia mais expressiva para profilaxia dessas doenças seria o desenvolvimento de vacinas capazes de proteger os indivíduos que estiverem em áreas de risco de transmissão dos patógenos.

Este projeto visa o desenvolvimento de uma vacina não-injetável contra a leishmaniose tegumentar, uma doença endêmica no Brasil. Os ensaios de imunização/desafio em animais experimentais são considerados etapas iniciais no desenvolvimento de vacinas com objetivo de avaliar a eficácia protetora. Além disso, a caracterização do tipo de resposta imune gerada é fundamental para a compreensão da proteção contra a doença estudada.

Dessa forma, a investigação dos mecanismos imunes nos momentos mais iniciais e intermediários induzidos pela infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*, em animais previamente imunizados pelo protótipo vacinal LaAg pela via intranasal, poderá fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de vacinas eficazes que possam no futuro trazer benefícios incalculáveis para as populações que vivem em áreas de risco de desenvolver leishmaniose tegumentar Americana.

Além disso, o desenho de estudos que permitam estabelecer parâmetros imunológicos associados com a patogênese da LTA é de fundamental importância para melhor compreensão da doença. Os estudos em humanos trazem informações relevantes, mas não é possível serem realizados alguns protocolos que necessitam de rigoroso controle de certas variáveis, que só poderão ser controladas em modelos experimentais. Como elemento complicador, a infecção pela *L. braziliensis*, que é o parasito associado à maioria dos casos de LTA no Brasil e na América Latina, tem seu estudo limitado pela dificuldade de se realizar estudos em modelos experimentais.

O modelo hamster dourado se apresenta como o mais factível para o estudo da doença já que desenvolve lesões cutâneas de curso crônico que em muito se assemelham às úlceras observadas em humanos. Embora, seja muito utilizado como modelo para a leishmaniose visceral, são ainda escassas as investigações utilizando cepas dermatrópicas, estando estas praticamente restritas a estudos de efeitos de drogas e comportamento de cepas de *Leishmania*. Mais ainda, a amplitude das abordagens imunopatogênicas é reduzida pela pouca disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos para hamster.

Assim, o fato do hamster reproduzir a infecção por *L. braziliensis* nos faz considerá-lo um modelo muito apropriado para o estudo de mecanismos envolvidos na patogênese da doença, bem como da imunogenicidade de compostos vacinais. A contribuição deste trabalho é estabelecer parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos associados à evolução da infecção por espécies dermatrópicas de *Leishmania* em hamster dourado, visando trazer novas perspectivas de avaliação de possíveis candidatos vacinais contra a LTA.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

O objetivo geral desse estudo foi investigar a relação entre a eficácia protetora contra a infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* em animais previamente imunizados via intranasal com LaAg e a resposta imune desses animais em momentos mais precoces ao longo da evolução da lesão. Além disso, comparar as alterações clínicas, parasitológicas e imunológicas do modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) durante a evolução da infecção por *L. amazonensis* com os observados na infecção por *L. braziliensis*.

#### **Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a eficácia protetora e a resposta imune associada a proteção em modelo hamster dourado contra a infecção por *L. amazonensis* em animais previamente imunizados com LaAg por via intranasal.
- 2) Investigar os parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos associados à infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, nos momentos iniciais e intermediários (5, 30 e 50 dias), em hamsters previamente imunizados pelas vias intranasal ou intramuscular com LaAg.
- 3) Comparar as alterações dos parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos durante a evolução da infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* no modelo hamster e sua relação com a patogênese da leishmaniose tegumentar humana.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados 120 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) – FIOCRUZ (RJ) e os mesmos foram mantidos em condições normais no Biotério de Experimentação Animal, localizado no Pavilhão Carlos Chagas (FIOCRUZ RJ). Este estudo está inserido em um projeto com número de licença L-007/2017, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) em 22 de fevereiro de 2017.

### **4.2. Parasitos**

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) e de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) acrescido de L-glutamina (1mM/ml), antibiótico (penicilina: 200U/ml; estreptomicina: 200µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, BR) (Schneider suplementado), em temperatura de 26°C até atingirem a fase estacionária de desenvolvimento (quarto dia de cultura), previamente determinada pela curva de crescimento para ambas as espécies.

### **4.3. Antígeno vacinal**

O antígeno LaAg foi preparado a partir de promastigotas de *L. amazonensis*, obtidas após quatro dias de cultura livre de contaminação com fungo ou bactérias (como descrito por Pinto *et al.* 2003). Os parasitos foram centrifugados e lavados duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) (1900 x g, por 15 minutos a 20°C). Após contagem em câmara de Neubauer, a massa de parasitos foi homogeneizada em PBS de modo a se obter  $2 \times 10^8$  promastigotas/ml. Em seguida essa suspensão de promastigotas foi submetida a 15 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento sob agitação mecânica com auxílio de um homogeneizador tipo “vórtex” para lise das formas parasitárias. A concentração proteica do dessa solução rica em antígenos do parasito (LaAg) foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Após esse procedimento, o antígeno foi alíquotado em microtubos com 1mg/ml e armazenado a -20 °C, de forma a evitar repetidos descongelamentos e congelamentos de uma mesma alíquota.

#### **4.4. Imunização e infecção**

Os animais foram separados em 3 grupos (n= 5-8 em cada grupo) e foram imunizados com duas doses de 20µg de LaAg em 20µl de PBS sem adjuvante pela via intranasal utilizando uma micropipeta, ou com duas doses de 20µg de LaAg em 50µl PBS sem adjuvante pela via intramuscular utilizando uma seringa tuberculina de 1ml (Becton, Dickinson and Company, EUA). O intervalo entre as doses foi de quatorze dias. O grupo controle foi constituído por animais não vacinados. Após quatorze dias da segunda imunização, os hamsters foram infectados no dorso da pata posterior direita com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* por via subcutânea em volume final de 20µl de PBS utilizando uma seringa e agulha *Ultra-fine* 0,5ml (Becton, Dickinson and Company, EUA).

#### **4.5. Avaliação da eficácia vacinal**

O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente através da medida do aumento do tamanho da pata infectada em relação à pata contralateral, utilizando um medidor de espessura (Mitutoyo, Brasil).

Ao final do acompanhamento, os animais foram pesados e em seguida foram eutanasiados com a utilização dos agentes injetáveis Cloridrato de quetamina (200mg/kg) associado ao Cloridrato de Xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal como medicação pré-anestésica, e o barbitúrico Tiopental em sobredose anestésica (150mg/kg) por via intraperitoneal.

Após a eutanásia, uma fração do fragmento de tecido da lesão proveniente da pata infectada e do linfonodo poplíteo drenante da pata infectada, foram coletados, pesados e macerados para determinar a carga parasitaria pelo método de diluição limitante – LDA (adaptado de Silva *et al.*1994). Para realizar a LDA os fragmentos de tecidos foram macerados dentro de uma placa de Petri, contendo uma tela de aço inoxidável de 64µm. Com o auxílio da base de um êmbolo de seringa, o fragmento foi macerado em 1 mL de meio de cultura Schneider suplementado, através do atrito entre a base do êmbolo e a tela de aço. Todo este procedimento foi realizado dentro de uma cabine de segurança biológica com material estéril. Em seguida, 20µL do produto do macerado foi diluído em 180 µL de meio de cultura Schneider completo em poço de fundo chato de placa de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, EUA) em quadruplicata. A partir do primeiro poço, foram feitas 12 diluições seriadas (fator de diluição de 1:10). As placas foram então

incubadas a 26°C em uma estufa BOD (Fanem, São Paulo, Brasil) e avaliadas quanto à presença de promastigotas vivas visualizadas em microscópio invertido (magnitude 4000) em um intervalo de 3 em 3 dias, por um período máximo de 15 dias. O resultado foi expresso em número de parasitas por grama de tecido que foi calculado pela média das últimas diluições da quadruplicata em que foram observados parasitos viáveis, dividido pelo peso do fragmento de tecido.

#### **4.6. Avaliação da resposta imune**

Após o acompanhamento das lesões, foram realizadas as seguintes avaliações da resposta imune:

##### **4.6.1. Quantificação de imunoglobulinas anti-*Leishmania***

Após a eutanásia, foi coletado sangue por punção cardíaca em tubos contendo heparina sódica (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA). Posteriormente, foi realizada a separação do plasma após a centrifugação (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) a 670 x g durante 10 min a 20°C. O plasma foi aliquoteado em microtubos e armazenados a -20°C até o momento da dosagem de Imunoglobulinas anti-*Leishmania*.

Os anticorpos anti-*Leishmania* presentes no plasma, foram quantificados pelo método imuno-enzimático ELISA, conforme descrito por (Gomes-Silva *et al.* 2008). Para isso, placas MaxiSorb de 96 poços fundo chato (Thermo Fisher Scientific – Nunc Brand, EUA) foram sensibilizadas adicionando 50µl de antígeno total de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* por poço (concentração final a 40µg/ml). O antígeno escolhido para sensibilizar a placa de ELISA (*L. braziliensis* ou *L. amazonensis*) foi sempre o de mesma espécie de *Leishmania* utilizada na infecção. Os antígenos foram diluídos em tampão de ligação (bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, pH 9,6). A placa foi incubada *overnight* à 4°C em câmara úmida. Em seguida a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (400µl/poço) constituída de PBS + 0,005% de Tween 20 (PBS-T) e incubada por 1 hora e 30 minutos a 20°C com 400µl/poço de tampão de bloqueio (PBS + 10% SFB). Após esse período, novo ciclo de três lavagens com PBS-T foi realizado.

Para dosagem de IgG as amostras de plasma foram diluídas em tampão de bloqueio (1:500) e adicionadas em duplicata com volume final de 50 µl por poço. Em seguida a placa foi incubada a 20°C por 2 horas. Após este período, a placa foi



lavada por seis vezes com tampão PBS-T (400µl por poço). Em seguida adicionado em cada poço 50µl de anti-IgG de hamster produzido em cabra e conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA) diluído 1:500 em tampão de bloqueio. Após incubação de uma hora, a 20°C um novo ciclo de seis lavagens foi realizado.

Para dosagem de IgG2 as amostras de plasma foram diluídas em tampão de bloqueio (1:50) e adicionadas em duplicata com volume final de 50 µl por poço. Em seguida a placa foi incubada a 20°C por 2 horas. Após este período, a placa foi lavada por seis vezes com tampão PBS-T (400 µl por poço). Em seguida adicionado em cada poço 50µl anti-IgG2 de hamster conjugado com biotina (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) diluído 1:200 em tampão de bloqueio. Após incubação de uma hora, a 20°C um novo ciclo de seis lavagens foi realizado. Em seguida foi adicionado em cada poço 50 µl de peroxidase (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) diluído 1:200 em tampão de bloqueio. Após incubação de uma hora, a 20°C um novo ciclo de seis lavagens foi realizado.

Tanto para dosagem de IgG quanto para IgG2, após as últimas lavagens mencionadas acima com tampão PBS-T foi adicionado aos poços 50µl de solução reveladora (2,5mg deo-phenylenediamine + 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol + 12,5 ml de tampão OPD [fosfato de sódio Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + Ácido cítrico 0,06M pH 9,6]). A placa foi incubada por 15 minutos, e a reação foi então interrompida com 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura foi realizada por um espectrofotômetro (E Max Precision Microplate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), com filtro de comprimento de onda 492nm. Os resultados foram expressos como densidade óptica (DO).

#### **4.6.2. Expressão gênica por RT qPCR**

A resposta imune celular foi avaliada com base na quantificação da expressão gênica de citocinas e enzimas envolvidas na imunopatogênese da LTA, conforme descrita por Ribeiro-Romão e colaboradores (2016). Para isso, fragmentos de pele e linfonodo poplíteo foram coletados com auxílio de material cirúrgicos (pinça e tesouras) e armazenados em microtubos livres de RNase (Axygen Scientific, Califórnia, EUA) contendo 300 microlitros de RNA later (Qiagen, Duesseldorf, Alemanha), sendo estes armazenados a -20°C, até o momento da extração do mRNA.

Para a extração do RNA, fragmentos de pele ou linfonodo de 20 a 30 mg foram transferidos para um microtubo de 2 mL contendo 1 ml de Trizol<sup>®</sup> (Life

Technologies, California, EUA) e lisados com auxílio do Homogeneizador de tecido Ultra-TurraxDispenser (IKA, Wilmington, EUA). Para a digestão tecidual, 10 µL de Proteinase K (10 mg/ml) (Invitrogen, California, USA) previamente aquecido a 37°C por 10 minutos foi adicionado às amostras e incubado a 56°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio sendo homogeneizadas vigorosamente por 20 segundos e centrifugadas a 10000 x g por 18 minutos a 4°C, para a separação das fases orgânica e aquosa. O RNA total foi extraído a partir da fase aquosa, utilizando o RNeasy mini Kit (Qiagen, Austin, Texas, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Após extração e purificação, o RNA foi dosado por espectrofotometria no Picodrop P200 (Astranet Systems, UK) e armazenado a -80°C.

Após a quantificação, 2 µg do RNA foi tratado com 2 µL de DNase I (Promega Corporation, Madison WI, EUA) para remoção do DNA genômico. Para a realização da transcrição reversa, foi utilizado o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme orientações do fabricante. O cDNA foi então quantificado por fluorometria, utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA), ajustado para uma concentração final de 10 ng/µL e armazenado a -20°C.

Para os ensaios de PCR em tempo real, foram utilizados 2 µL de cDNA (a 10 ng/µL), com 5,0 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Life Technologies, CA, EUA), em um volume final de 10 µl por poço em duplicata, com 100 nM de primers iniciadores e 100 nM de primers reversos (exceto para os primers IL-4, onde foram utilizados 200 nM de primers iniciadores e 200 nM de primers reversos), no equipamento ViiA™ 7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em placas de 384 poços. As condições de ciclo de PCR foram: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C / s a 90°C. A expressão gênica foi calculada por quantificação relativa usando o método do  $\Delta\Delta C_t$  comparativo, com o limiar ajustado em 0,02 (threshold). Como genes de referência, foram utilizados os genes GAPDH e  $\gamma$ -Actina (Tabela 1). Os resultados foram expressos em  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ou “fold change” da expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação), que representa o quanto a expressão gênica do alvo foi alterada no tecido analisado comparado com a expressão gênica no calibrador da reação. Para

a validação da expressão constitutiva de candidatos a genes de referência e análise de expressão gênica, foi utilizado o software Expression Suite (Life Technologies).

**Tabela 1** – Alvos e sequências de *primers* específicos para genes de hamster utilizados nos ensaios de RT PCR em Tempo Real.

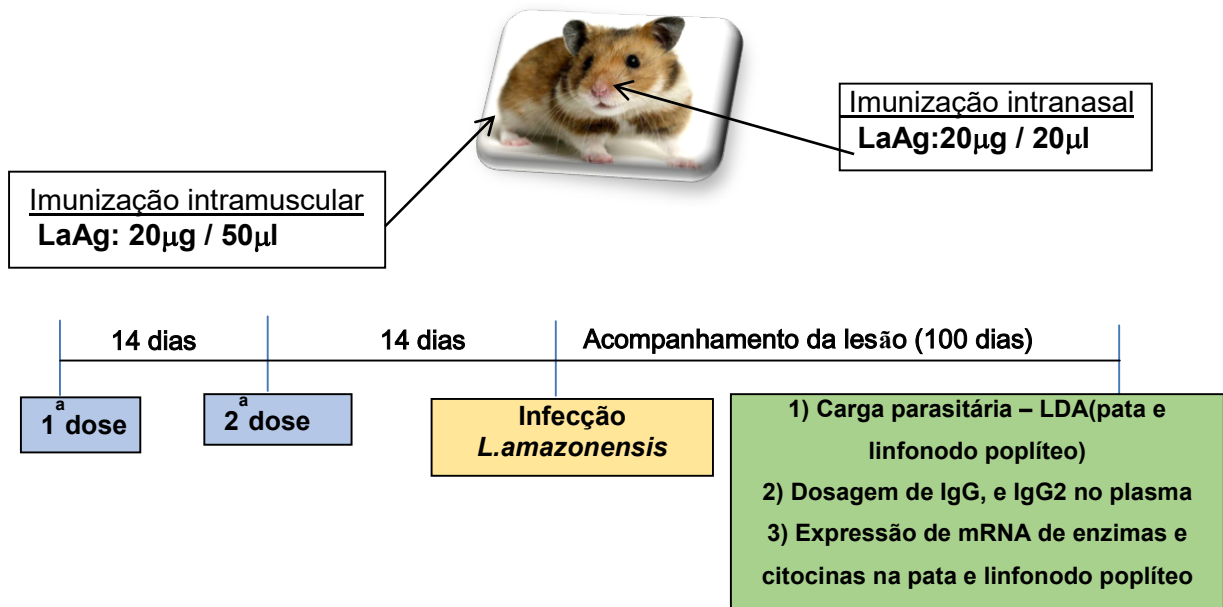
<b>Alvo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>	<b>Referência</b>
GAPDH	<b>Fw5'</b> -GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3' <b>Rv5'</b> -TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	69 pb	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> 2014
$\gamma$ Actina	<b>Fw5'</b> -ACA GAG AGA AGA TGA CGC AGA TAA TG-3' <b>Rv 5'</b> -GCC TGA ATG GCC ACG TAC A-3'	70 pb	Espitia <i>et al.</i> 2010
IFN- $\gamma$	<b>Fw5'</b> -TGT TGC TCT GCC TCA CTC AGG-3' <b>Rv5'</b> -AAG ACG AGG TCC CCT CCA TTC-3'	130 pb	Espitia <i>et al.</i> 2010
TGF- $\beta$	<b>Fw5'</b> -GGC TAC CAC GCC AAC TTC TG-3' <b>Rv5'</b> -GAG GGC AAG GAC CTT ACT GTA CTG-3'	81 pb	Espitia <i>et al.</i> 2010
TNF	<b>Fw5'</b> -TGA GCC ATC GTG CCA ATG-3' <b>Rv5'</b> -AGC CCG TCT GCT GGT ATC AC-3'	79 pb	Espitia <i>et al.</i> 2010
IL-10	<b>Fw5'</b> -GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3' <b>Rv5'</b> -TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	194 pb	Espitia <i>et al.</i> 2010
IL-4	<b>Fw5'</b> -CCA CGG AGA AAG ACC TCA TCT G-3' <b>Rv5'</b> -GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT AAA-3'	72 pb	Zivcecet <i>et al.</i> 2011
IL-6	<b>Fw5'</b> -GGA CAA TGA CTA TGT GTT GTT AGA A-3' <b>RV 5'</b> - AGG CAA ATT TCC CAA TTG TAT CCA G-3'	99 pb	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> 2016
iNOS	<b>Fw5'</b> -TGA GCC ACT GAG TTC TCC TAA GG-3' <b>Rv5'</b> -TCC TAT TTC AAC TCC AAG ATG TTC TG-3'	93 pb	Osorio <i>et al.</i> 2012
Arginase	<b>Fw5'</b> -ACC TAT GTG TCA TTT GGG TGG A-3' <b>Rv5'</b> -GCA GAT ATG CAG GGA GTC ACC-3'	163pb	Osorio <i>et al.</i> 2012

#### **4.7. Análise estatística**

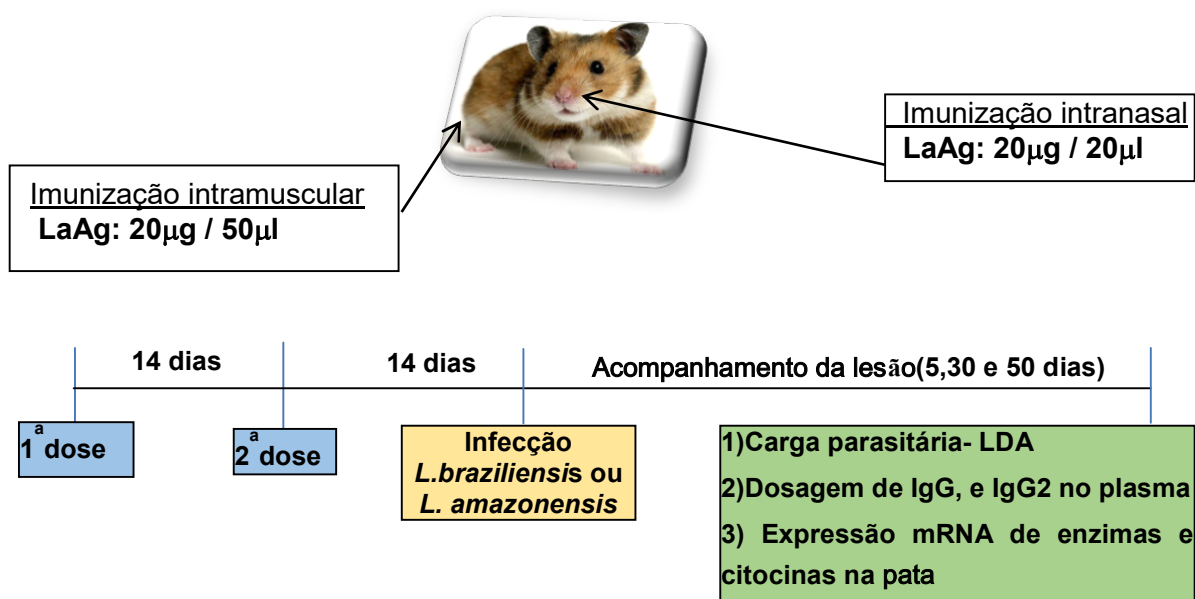
Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Foi avaliada a significância em comparações simples entre dois grupos através do teste Mann-Whitney não paramétrico. Para comparações de múltiplos grupos foram feitas análise de variância (ANOVA) não paramétrica. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de  $p \leq 0.05$ .

## 5. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA

### ESTRATÉGIA 1. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA VACINAL DO LaAg ADMINISTRADO PELAS VIAS INTRANASAL OU INTRAMUSCULAR CONTRA A INFECÇÃO POR *L. amazonensis* NO MODELO HAMSTER



### ESTRATÉGIA 2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA VACINAL E DA RESPOSTA IMUNE NOS MOMENTOS INICIAIS E INTERMEDIÁRIOS APÓS A INFECÇÃO POR *L. amazonensis* OU *L. braziliensis* NOS HAMSTERS PREVIAMENTE VACINADOS COM LaAg PELAS VIAS INTRANASAL OU INTRAMUSCULAR



**ESTRATÉGIA 3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DURANTE A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* OU *L. amazonensis* NO MODELO HAMSTER**



50 e 100 dias

Infecção  
*L. braziliensis* ou *L. amazonensis*

- 1) Carga parasitária (pata e linfonodo poplíteo)
- 2) Dosagem de IgG, e IgG2 no plasma
- 3) Expressão de mRNA de enzimas e citocinas na pata e linfonodo poplíteo

## 6. RESULTADOS

Os resultados dessa tese serão apresentados em sessões que foram subdivididas de acordo com os objetivos específicos. Para isso, antes de cada conjunto de resultados será apresentado um breve racional no qual se baseou a construção da pergunta associada a cada desses objetivos.

### **Objetivo 1 - Avaliar a eficácia protetora e a resposta imune associada à proteção contra a infecção por *L. amazonensis* em hamsters previamente imunizados com LaAg por via de mucosa nasal**

Resultados anteriores obtidos com a utilização do modelo murino demonstraram que a imunidade protetora induzida pelo candidato vacinal LaAg contra a infecção por *L. amazonensis* foi criticamente dependente da via de imunização. A vacinação com LaAg pelas vias subcutânea e intramuscular induziu uma exacerbação no desenvolvimento da lesão (Pinto *et al.* 2003; Pinheiro *et al.* 2005), enquanto que a vacinação intranasal com LaAg induziu proteção contra a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c (Pinto *et al.* 2004) e C57/BL6 (Pratti *et al.* 2016).

Nosso grupo tem estudado nos últimos anos as alterações clínicas e imunopatológicas durante a evolução da infecção por *L. braziliensis* no hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) (Gomes-Silva *et al.* 2013; Ribeiro-Romão *et al.* 2014), investindo na padronização de técnicas moleculares e imunológicas para análise da resposta imune neste modelo experimental (Ribeiro-Romão *et al.* 2016). Um estudo de eficácia vacinal demonstrou de forma inédita a eficácia do protótipo vacinal LaAg administrado por via intranasal contra a infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster (Da Silva-Couto *et al.* 2015).

Baseado nesses resultados foi questionado se a eficácia protetora da imunização via mucosa nasal com LaAg também seria observada contra a infecção por *L. amazonensis* no modelo hamster.

## Resultados referentes ao Objetivo 1:

### 6.1. Eficácia vacinal e evolução clínica da lesão

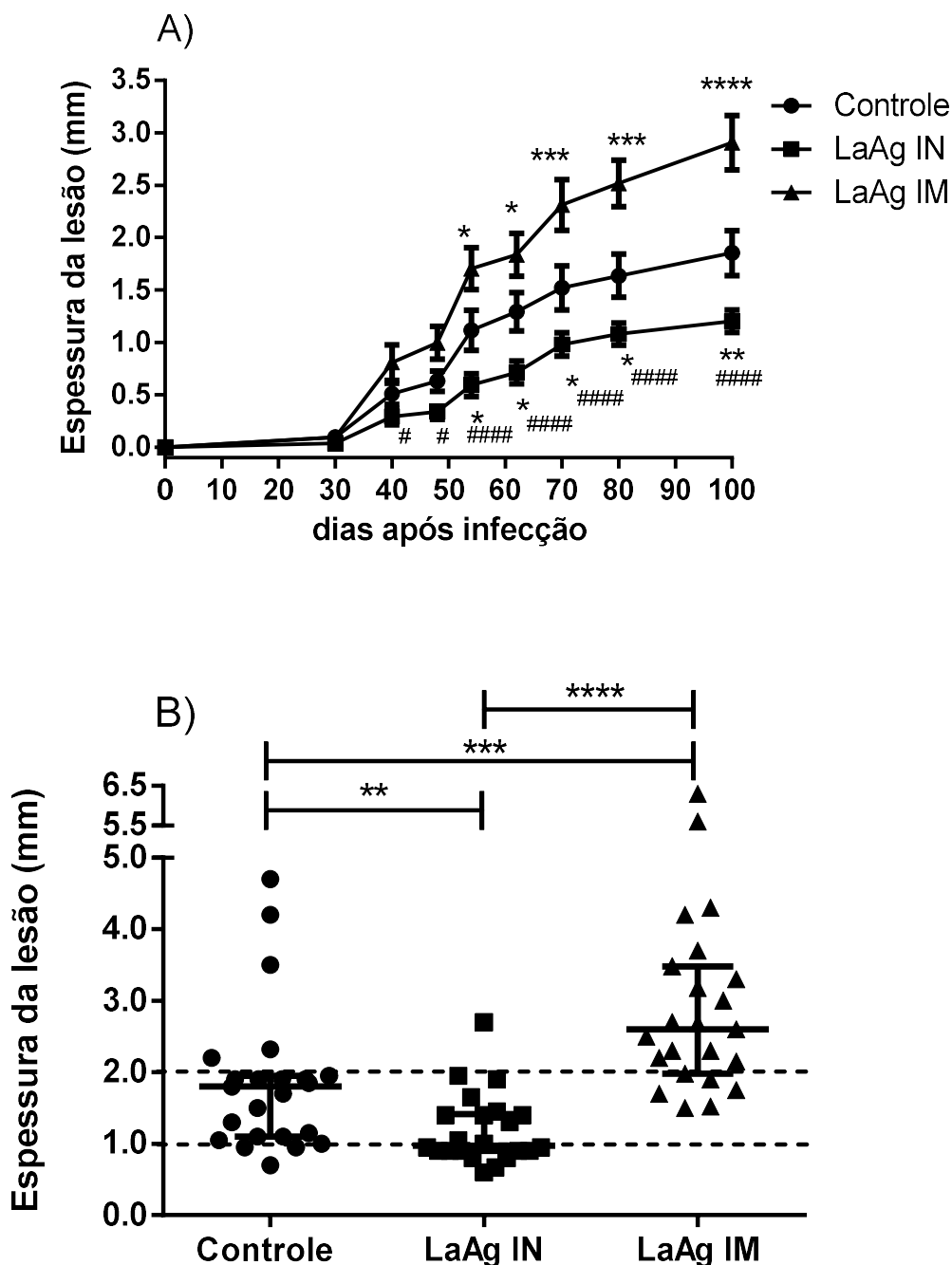
A eficácia vacinal foi avaliada por meio do acompanhamento semanal da morfometria das patas infectadas e contralateral. No grupo imunizado com LaAg por via intranasal (LaAg IN) foi observado um retardo no crescimento da pata infectada em relação ao grupo controle (não imunizados) e em relação ao grupo imunizado com LaAg por via intramuscular (LaAg IM) (Figura 6.1 A).

A partir do 48° dia após o desafio, os hamsters do grupo LaAg IN apresentaram uma menor espessura da pata quando comparados com os hamsters do grupo LaAg IM (espessura média da pata com 48 dias pós infecção: LaAg IN=0,19mm e LaAg IM=0,71mm,  $p < 0,001$ ). Essa diferença permaneceu significativa até o ponto final do acompanhamento. Quando comparado o grupo LaAg IN com o grupo controle, as diferenças significativas foram observadas no 62° dia (LaAg IN=0,57mm e Controle=0,97mm,  $p < 0,05$ ) e no 100° dia (LaAg IN=1,14mm e Controle=1,58mm,  $p < 0,01$ ) de acompanhamento da lesão. A partir do 54° dia até o final do experimento foi observado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do tamanho médio da espessura da pata do grupo LaAg IM (54° dia= 1,28mm; 62°dia=1,47mm; 70° dia=1,80mm; 80° dia=2,09mm e 100° dia=2,32mm), em relação ao grupo controle (54° dia= 0,72mm; 62°dia=0,97mm; 70° dia=1,14mm; 80° dia=1,31mm e 100° dia=1,58mm) (Figura 6.1 A).

No último dia de acompanhamento da infecção, 10 de 16 animais (62,5%) do grupo LaAg IN apresentaram lesões de menor gravidade, medindo menos de 1 mm de espessura. Por outro lado, apenas 1 de 16 animais (6,25%) do grupo LaAg IM teve lesão com tamanho inferior a 1mm de espessura (Fig. 6.1B).

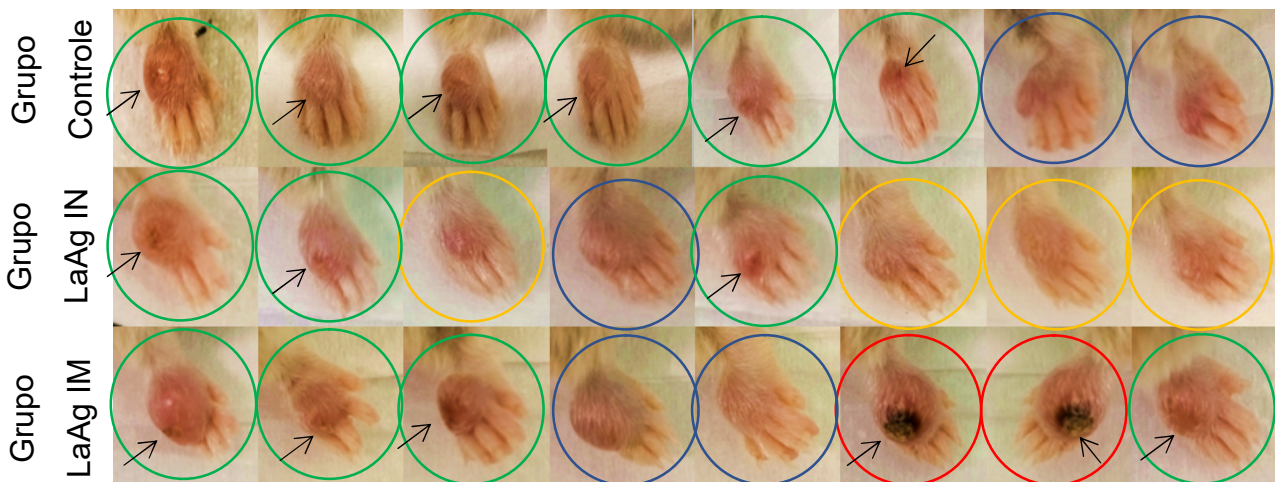
Além disso, apenas 6 de 16 animais do grupo LaAg IN (37,5%) apresentaram lesões entre 1 e 2 mm de espessura, não sendo observado lesões superiores a 2 mm de espessura neste grupo. No grupo controle foi observado que 14 de 16 animais (87,5%) apresentaram lesões entre 1 e 2 mm de espessura e 1 de 16 animais (6,25%) apresentou lesão superior a 2mm de espessura. Quando analisamos o grupo LaAg IM, observamos que 6 dos 16 animais (37,5%) tiveram lesões entre 1 e 2 mm de espessura e 10 dos 16 animais do grupo LaAg IM (62,5%) apresentaram lesões superiores a 2 mm de espessura (Fig.6.1B).





**Figura 6.1 - Desenvolvimento da lesão cutânea causada pela infecção por *L. amazonensis* em hamster previamente imunizados com LaAg pelas vias intranasal ou intramuscular** A) Morfometria de hamsters previamente imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pela via intranasal (LaAg IN), ou imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pela via intramuscular (LaAg IM). O grupo controle que não recebeu nenhum veículo prévio também foi infectado como descrito anteriormente. Cada ponto representa a média dos valores de aumento da lesão, e as barras representam o erro padrão. B) Tamanho da lesão cutânea localizada no dorso da pata de cada animal no último dia de acompanhamento (100 dias). Cada ponto representa um animal. A linha horizontal contínua na posição central representa a mediana e as linhas contínuas inferiores e superiores representam os intervalos interquartis de 25% e 75%, respectivamente. Para ambas as figuras os dados são referentes a 3 experimentos independentes com 7-8 animais por grupo. O símbolo (\*) indica significância estatística quando comparados os grupos vacinados e o grupo controle, e o símbolo (#) quando comparados os grupos LaAg IN e LaAg IM. \* ou #  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* ou #####  $p < 0,0001$ .

O aspecto clínico da lesão cutânea ao final de 100 dias após infecção por *L. amazonensis* foi registrado em imagem fotográfica em um dos experimentos independentes. O painel abaixo representa o aspecto da lesão em animais representantes dos grupos Controle, LaAg IN, e LaAg IM (Painel 6.1). Alterações cutâneas de menor gravidade como alopecia associada a eritema, descamação da pele e discreto edema pôde ser observado em 4 de 8 animais (50%) do grupo LaAg IN (círculo laranja, Painel 6.1). Essa descrição não foi observada em animais dos grupos Controle e LaAg IM. Alterações cutâneas com aspecto nodular associada a pequena úlcera pôde ser observada em 6 de 8 animais (75%) do grupo controle, em 4 de 8 animais (50%) no grupo LaAg IM, e 3 de 8 animais (37,5%) no grupo LaAg IN (círculo verde, Painel 6.1). Alterações cutâneas nodulares sem a presença de úlceras foi observada em 2 de 8 animais (25%) do grupo controle e do grupo LaAg IM, em 1 de 8 animias (12,5%) do grupo LaAg IN (círculo azul, Painel 6.1). Alterações cutâneas caracterizadas por importante edema com presença de úlcera extensa com aspecto de necrose foi observada em 2 de 8 animais (25%) do grupo LaAg IM (círculo vermelho, Painel 6.1).



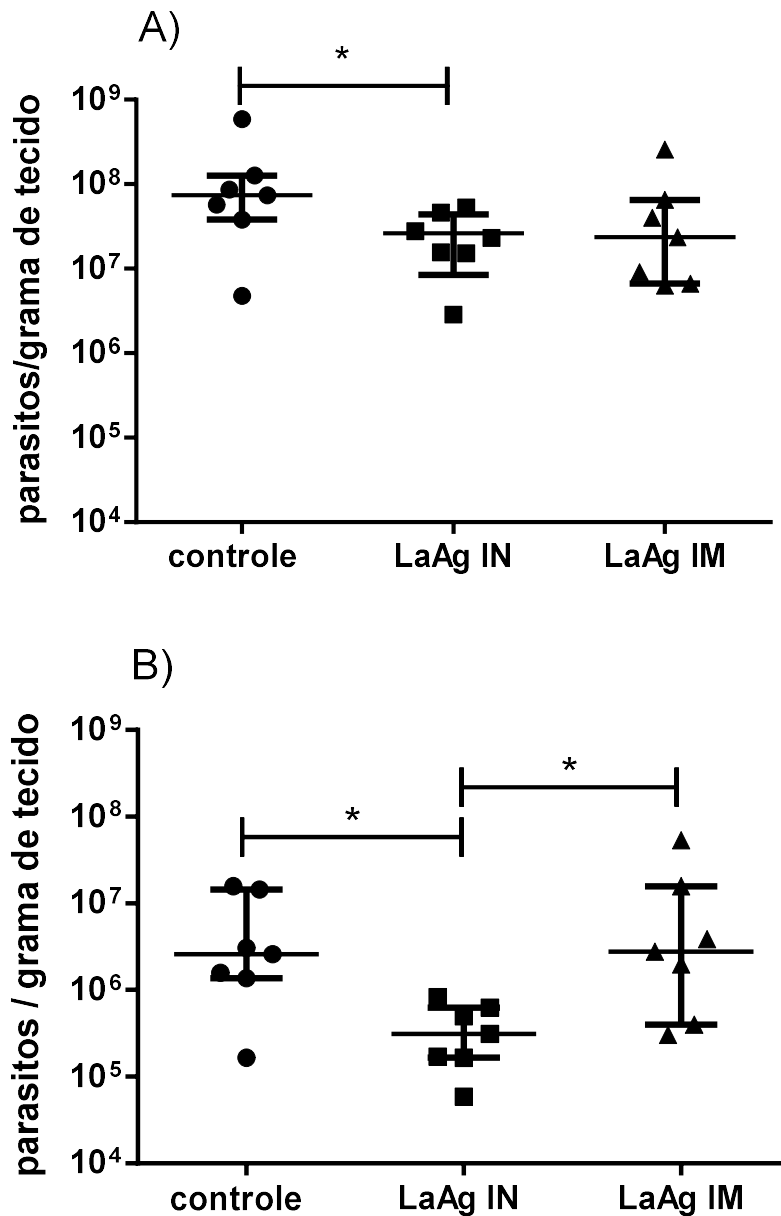
**Painel 6.1 - Avaliação macroscópica da lesão cutânea localizada no dorso da pata infectada.**

Ao final do acompanhamento de 100 dias após a infecção subcutânea com  $1 \times 10^5$  *L. amazonensis*, foi feito um registro fotográfico do aspecto clínico da lesão cutânea de cada animal pertencente aos grupos: Controle (não imunizado), LaAg IN (imunização intranasal), e LaAg IM (imunização intramuscular). Círculo laranja indica alterações como alopecia associada a eritema, descamação da pele e discreto edema; Círculo verde indica alterações cutâneas com aspecto nodular associada a pequena úlcera; círculo azul indica alterações cutâneas nodulares sem a presença de úlceras; e círculo vermelho indica alterações cutâneas caracterizadas por importante edema e presença de úlcera extensa com aspecto de necrose. Dados representativos de um experimento.

## 6.2. Eficácia vacinal e controle da carga parasitária

Para avaliar se a diminuição do tamanho da lesão, observada ao final do acompanhamento de 100 dias (ver Fig. 6.1) tem relação com a diminuição da carga parasitária, o número de parasitos foi quantificado na pata infectada e no linfonodo poplíteo correspondente pelo método de diluição limitante (LDA).

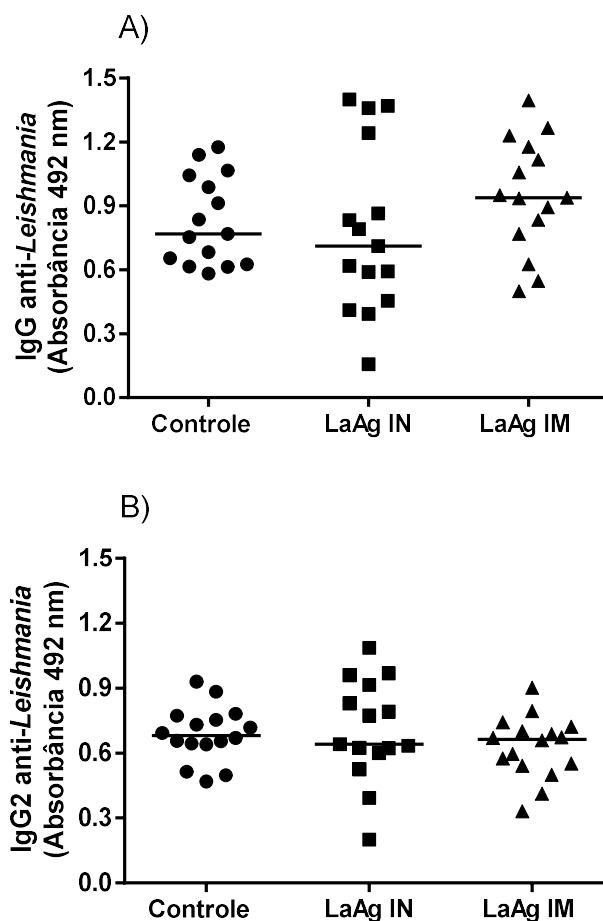
O grupo de animais LaAg IN apresentou uma menor carga parasitária na pata (mediana= $2,3 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido) em comparação com o grupo controle (mediana= $7,4 \times 10^7$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 6.2 A). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e LaAg IM (mediana= $2,4 \times 10^7$ ;  $p < 0,01$ ) e entre os grupos LaAg IN e LaAg IM. De forma semelhante, mas em menores proporções, o grupo LaAg IN apresentou menor carga parasitária no linfonodo (mediana= $3,1 \times 10^5$  parasitos/grama de tecido) em comparação com o grupo controle (mediana= $2,6 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ), e com o grupo LaAg IM (mediana= $2,8 \times 10^6$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 6.2 B). Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo LaAg IM. Este resultado indica que, em comparação com o grupo controle, a vacinação com LaAg IM não favoreceu a replicação da *L. amazonensis* mesmo tendo apresentado lesões aparentemente mais graves. Por outro lado, a vacinação com LaAg IN promoveu um menor crescimento da lesão, associada com aspectos clínicos mais brandos e redução do número de parasitos no local de infecção.



**Figura 6.2**—Quantificação da carga parasitária em animais infectados com *L. amazonensis* que foram previamente imunizados com LaAg intranasal ou LaAg intramuscular. Hamsters (n=7 por grupo) foram imunizados por via intranasal com 20 µg LaAg (LaAg IN) ou por via intramuscular com 20µg LaAg (LaAg IM) e infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. Controle é o grupo não imunizado. A carga parasitária foi determinada 100 dias após a infecção pelo método de diluição limitante utilizando como amostras (A) fragmento de tecido proveniente da pata infectada e (B) linfonodo poplíteo correspondente ao local de infecção. Os dados representam 1 experimento. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal do meio representa a mediana, e as linhas horizontais inferiores e superiores representam os intervalos interquartis de 25% e 75%, respectivamente. \*p < 0,05.

### 6.3. Avaliação da produção de Imunoglobulinas (IgG e IgG2) anti-*Leishmania*

Após 100 dias de infecção, os níveis plasmáticos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* dos grupos de animais previamente imunizados com LaAg IN ou LaAg IM, assim como animais controles não imunizados, foram semelhantes. (Fig. 6.3 A).



**Figura 6.3 - Análise quantitativa dos níveis de IgG e IgG2 anti-*Leishmania* por ELISA.** Hamsters (n=16 por grupo) foram imunizados por via intranasal ou por via intramuscular com 20  $\mu$ g LaAg e infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. Um grupo controle não imunizado também foi analisado. Em seguida eles foram infectados, e após 100 dias de evolução os animais foram eutanasiados e coletado sangue para determinar os níveis de imunoglobulinas específicas no plasma. A absorbância é referente a concentração plasmática de A) IgG anti-*Leishmania* e B) IgG2 anti-*Leishmania*. Os resultados são referentes a dois experimentos independentes. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal representa a mediana.

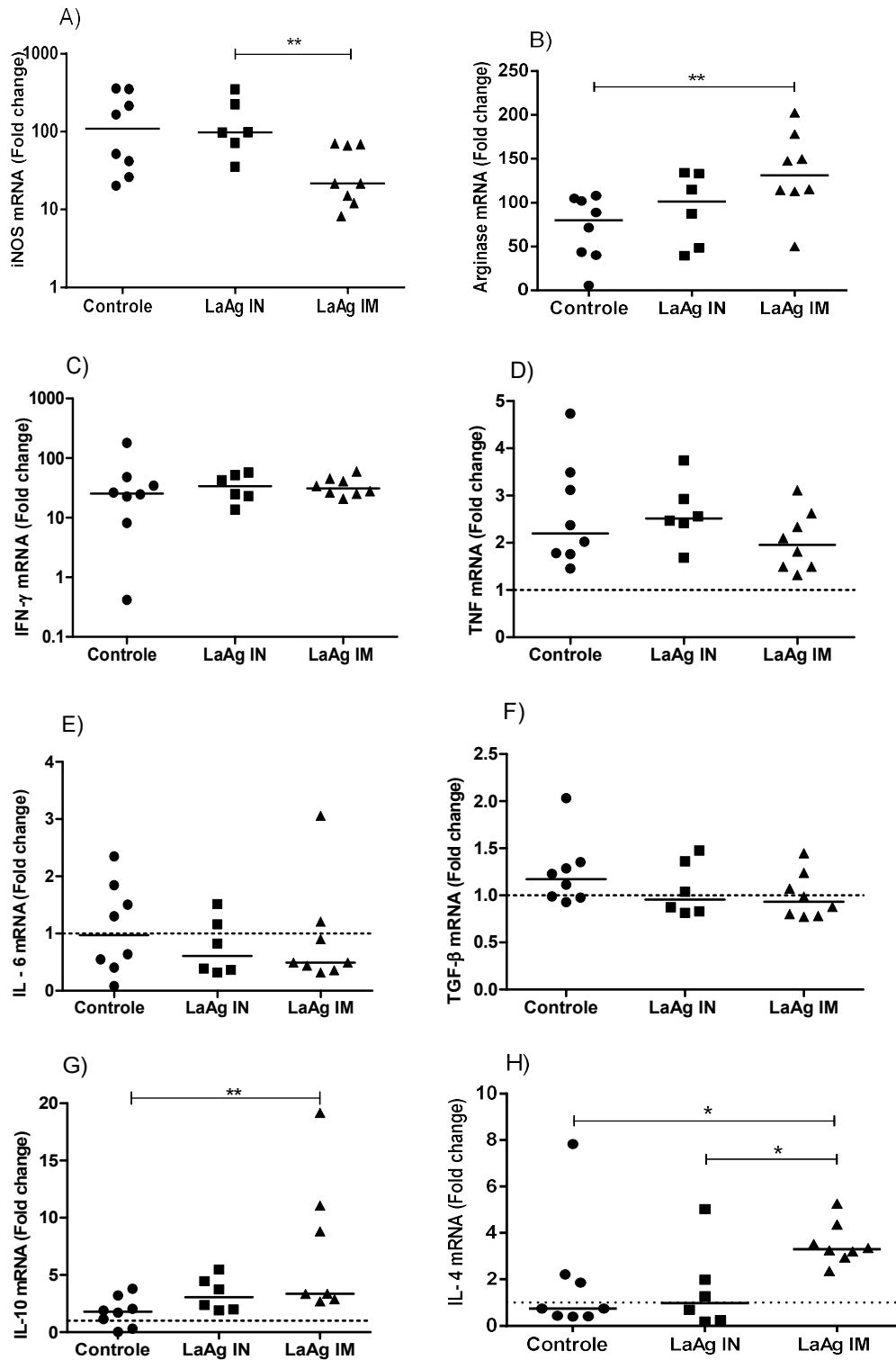
#### **6.4. Avaliação da expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento de pata 100 dias após a infecção por *L. amazonensis* em animais previamente vacinados**

O perfil da resposta imune no final do acompanhamento da lesão (100 dias após infecção) foi avaliado pelo ensaio de RT qPCR. A expressão gênica das enzimas iNOS e Arginase, e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , e IL-4 foi avaliada nos fragmentos de pata dos hamsters imunizados com LaAg IN ou LaAg IM. Os resultados foram expressos como valores de “fold change” da expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação).

A expressão gênica de iNOS observada no fragmento de lesão do grupo LaAg IM foi significativamente menor (mediana=22) quando comparada com o grupo LaAg IN (mediana=98;  $p<0,01$ ) (Figura 6.4 A). Não foi observada diferença significativa entre o grupo LaAg IN (mediana=98) e o grupo controle (mediana=109). Devido a dispersão apresentada pelo grupo controle, não houve diferença deste com o grupo LaAg IM. Por outro lado, foi observado um aumento significativo da expressão de Arginase no grupo LaAg IM (mediana=131) quando comparado com o grupo controle (mediana=80;  $p<0,01$ ). Esta diferença não foi observada entre o grupo LaAg IN (mediana=101) e o grupo controle, assim como, não houve diferença entre os grupos LaAg IN e LaAg IM (Fig. 6.4B).

A expressão gênica da citocina IL-10 na lesão foi significativamente maior no grupo LaAg IM (mediana=3,4) quando comparado ao grupo controle (mediana=2,0;  $p<0,01$ ). Essa diferença não foi observada entre os grupos LaAg IN (mediana=3,1) e grupo controle, assim como também não houve diferença entre os grupos LaAg IM e LaAg IN (Figura 6.4 G). O mesmo pôde ser visto para a expressão da citocina IL-4 na lesão cuja expressão no grupo LaAg IM (mediana=3,3) foi significativamente maior que no grupo controle (mediana=0,74;  $p<0,05$ ) e no grupo LaAg IN (mediana=0,98;  $p<0,05$ ). Não houve diferença de expressão de IL-4 nas lesões dos grupos LaAg IN e grupo controle (Fig. 6.4 H).

Não foram observadas nas lesões diferenças significativas de expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e TGF- $\beta$ , quando comparados os grupos LaAg IN, LaAg IM e grupo controle (Figura 6.4 C, D, E e F).



**Figura 6.4** Expressão gênica de citocinas e enzimas na lesão causada por *L. amazonensis* após 100 dias de infecção em animais que foram previamente imunizados com LaAg por via nasal ou intramuscular. Hamsters (8 por grupo) foram imunizados pelas vias intramuscular ou intranasal, com duas doses de 20  $\mu$ g de LaAg e intervalo de 14 dias entre as doses. O grupo controle não foi imunizado. Duas semanas após a última dose da vacina, os hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o “fold change” na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação representados pela linha tracejada). Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana: \*p < 0,05; \*\* p < 0,01.

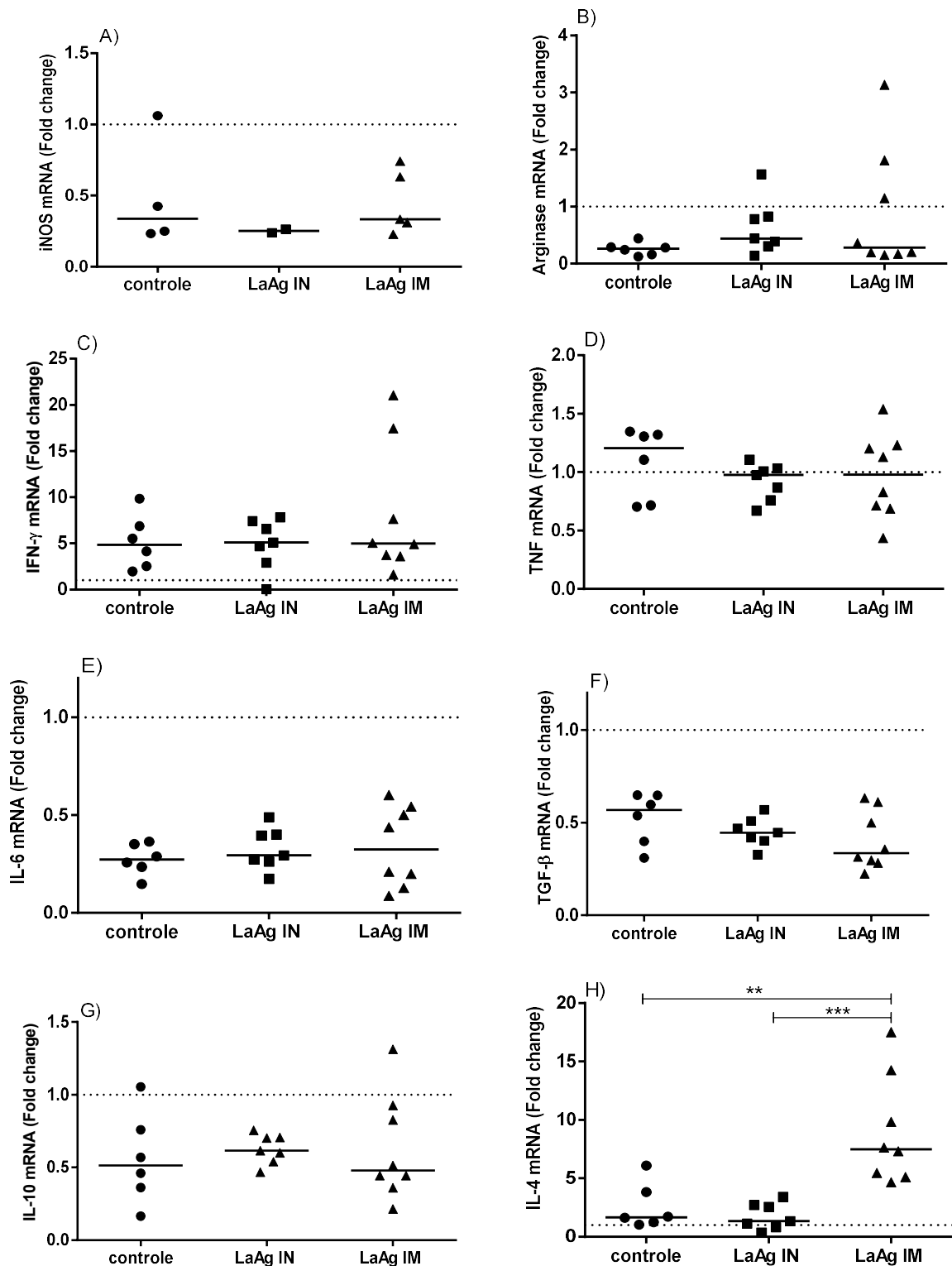
### **6.5. Avaliação da expressão gênica de enzimas e citocinas no linfonodo poplíteo drenante 100 dias após a infecção por *L. amazonensis* em animais previamente vacinados**

A expressão gênica das enzimas iNOS e Arginase, e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , e IL-4 foi avaliada no linfonodo poplíteo drenante dos hamsters imunizados com LaAg pelas vias intranasal ou intramuscular.

A expressão gênica de IL-4 em linfonodo do grupo LaAg IM (mediana=7,5) foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle (mediana=1,7;  $p < 0,01$ ), e ao grupo LaAg IN (mediana=1,3;  $p < 0,001$ ) (Figura 6.5 H).

Não foram observadas nos linfonodos drenantes diferenças significativas de expressão gênica para as enzimas INOS e arginase e de citocinas IFN-  $\gamma$  , TNF, IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10 quando comparados os grupos LaAg IN, LaAg IM e grupo controle (Figura 6.5 A, B, C, D, E, F e G).





**Figura 6.5 - Expressão gênica de citocinas e enzimas no linfonodo drenante de animais com 100 dias de infecção por *L. amazonensis*, que foram previamente imunizados com LaAg por via nasal ou intramuscular.** Hamsters (6-8 por grupo) foram imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pelas vias intramuscular ou intranasal, seguido de uma segunda dose 14 dias depois. O grupo controle não foi imunizado. Duas semanas após a última dose da vacina, os hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. A análise da expressão gênica no linfonodo poplíteo foi realizada após 100 dias da infecção. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o "fold change" na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Objetivo 2. Investigar os parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos associados à infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, nos momentos iniciais e intermediários (5, 30 e 50 dias), em hamsters previamente imunizados pelas vias intranasal ou intramuscular com LaAg**

Nesse trabalho foi confirmada o efeito protetor contra a infecção por *L. amazonensis* em hamster previamente imunizado com LaAg pela via de mucosa nasal. Dessa forma, a ideia sobre o potencial do LaAg IN em proteger animais experimentais contra espécies dermatrópicas de *Leishmania* (Pinto *et al.* 2004; Pratti *et al.* 2016; Da Silva-Couto *et al.* 2015) foi fortalecida por mais esse conjunto de resultados inéditos produzidos em modelo hamster.

No entanto, a avaliação da resposta imune associada a capacidade do grupo LaAg IN em controlar a infecção não se mostrou diferente daqueles grupos em que as lesões se manifestaram com maior gravidade. Como todas essas avaliações da relação entre resposta imune e o desfecho clínico foram realizadas após longo tempo de infecção (aproximadamente 100 dias), questionamos a possibilidade de que a definição de resposta imune responsável pelo controle do parasito ao longo do tempo pudesse ocorrer em momentos mais precoces a partir da imunização.

As análises foram inicialmente realizadas no tempo de 5 dias após a infecção. A expressão gênica das enzimas iNOS e Arginase, e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , e IL-4, foi avaliada na pata e no linfonodo poplíteo drenante das lesões dos hamsters dos grupos controle, LaAg IN e LaAg IM. Nesta fase da infecção (5<sup>o</sup> dia), a expressão gênica de todos os alvos nos 3 grupos analisados, se apresentou com os mesmos valores do calibrador da reação (tecido de animal não infectado) (dados não mostrados).

Dessa forma, nos propomos a investigar as alterações clínicas e a modulação da resposta imune 50 dias após a infecção de animais previamente imunizados com LaAg pela via intranasal ou intramuscular.

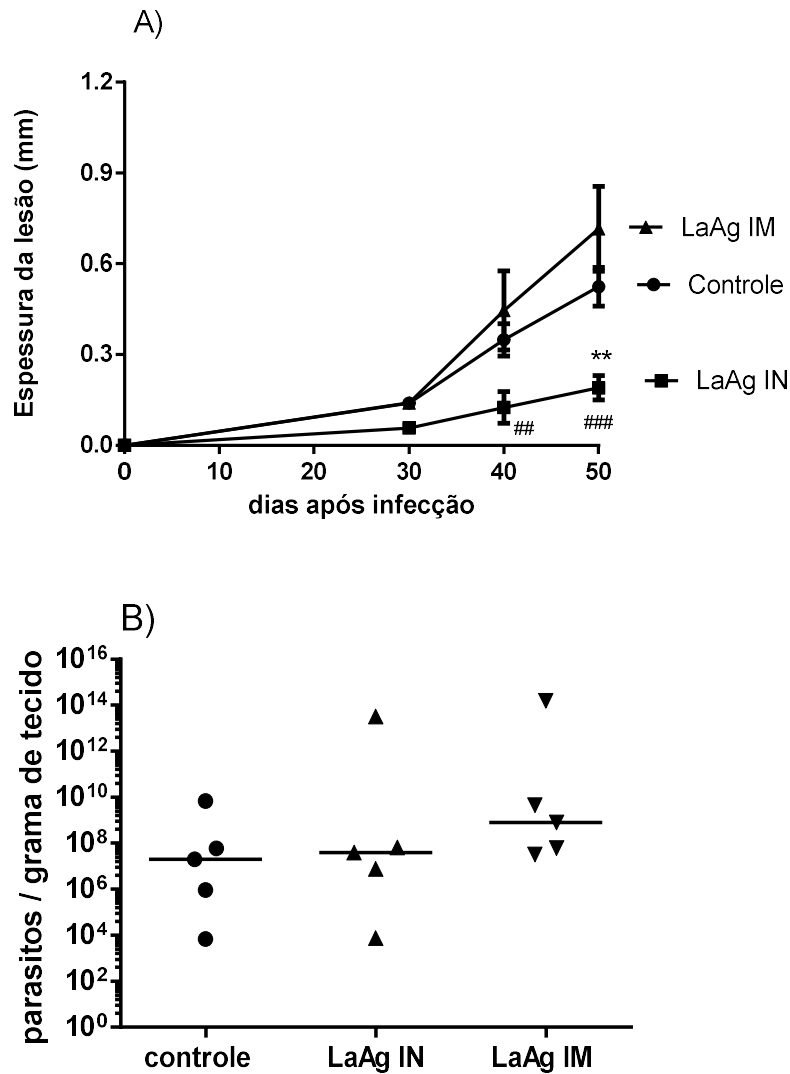
Esse tempo foi escolhido por ser o momento em que as diferenças do tamanho da lesão se mostraram significativas entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e controle.

**Parâmetros avaliados nos momentos intermediários do curso evolutivo (50 dias) da infecção por *L. amazonensis* no modelo hamster.**

#### **6.6. Acompanhamento da lesão e quantificação da carga parasitária após 50 dias de infecção por *L. amazonensis* em animais previamente imunizados com antígeno LaAg pela via intranasal ou pela via intramuscular**

O tamanho da lesão após 40 dias de acompanhamento após infecção, foi significativamente menor no grupo LaAg IN (média=0,12mm) quando comparado com o grupo LaAg IM (média=0,44mm;  $p < 0,01$ ). Nesse momento não houve diferença entre os grupos LaAg IN e o grupo controle. Após 50 dias de infecção, esta diferença no tamanho da lesão ficou mais evidente entre os grupos, se tornando significativa entre o grupo controle (média=0,52mm) e o grupo LaAg IN (média=0,19mm;  $p < 0,01$ ), assim como entre o grupo LaAg IN e o grupo LaAg IM (média=0,71,  $p < 0,001$ ). Neste período não houve diferença entre os grupos LaAg IM e controle (Figura 6.6A).

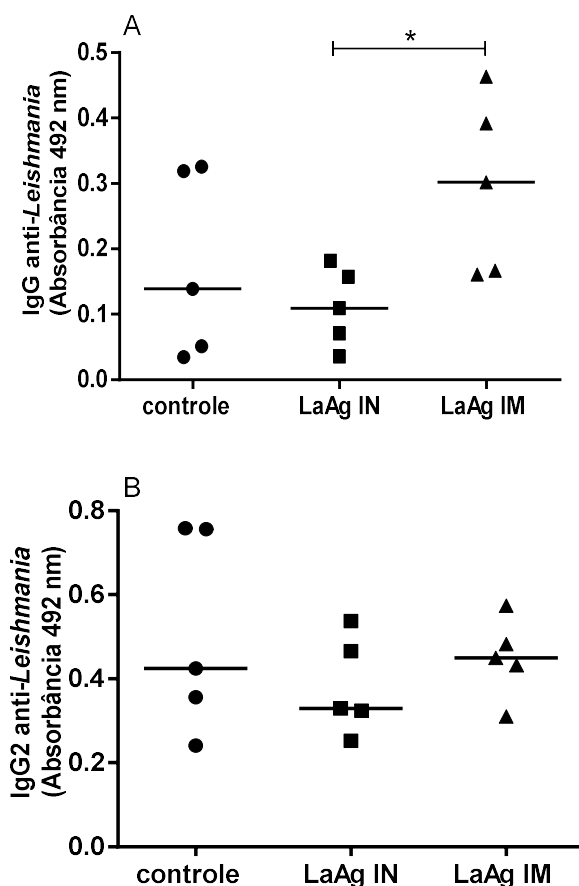
Em relação a carga parasitária desses hamsters, ao quinquagésimo dia após infecção, não foram observadas diferenças entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e o grupo controle (Figura 6.6 B).



**Figura 6.6 – Avaliação da eficácia protetora após 50 dias de infecção por *L. amazonensis* em animais previamente imunizados por via intranasal ou intramuscular com LaAg.** Hamsters (n=5 por grupo) foram imunizados por via intranasal com 20 µg LaAg (LaAg IN) ou pela via intramuscular com 20µg LaAg (LaAg IM) e infectados por via subcutânea no dorso da pata com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. A) Morfometria de pata de hamsters até 50 dias de infecção por *L. amazonensis*. Cada ponto representa a média dos valores de aumento da lesão, e as barras representam o erro padrão. B) Carga parasitária na pata determinada 50 dias após a infecção por *L. amazonensis* pelo método de diluição limitante. O grupo controle foi constituído por animais não vacinados. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal representa a mediana. O símbolo (\*) indica diferença significativa entre os grupos vacinados e o grupo controle, e o símbolo (#) indica diferença significativa entre os grupos vacinados. \*\* ou ## p < 0,01; ### p < 0,001.

### 6.7. Avaliação da produção de Imunoglobulinas (IgG e IgG2) anti-*Leishmania*

Após 50 dias da infecção por *L. amazonensis*, o grupo LaAg IM apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de IgG total anti-*Leishmania* (mediana= 0,30) quando comparado com o grupo LaAg IN (mediana= 0,10) (Figura 6.7 A). O grupo LaAg IN apresentou níveis baixos de IgG total anti-*Leishmania* e não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença estatística nos níveis de IgG2 anti-*Leishmania* entre os grupos LaAg IM, LaAg IN e o grupo controle (Figura 6.7 B).

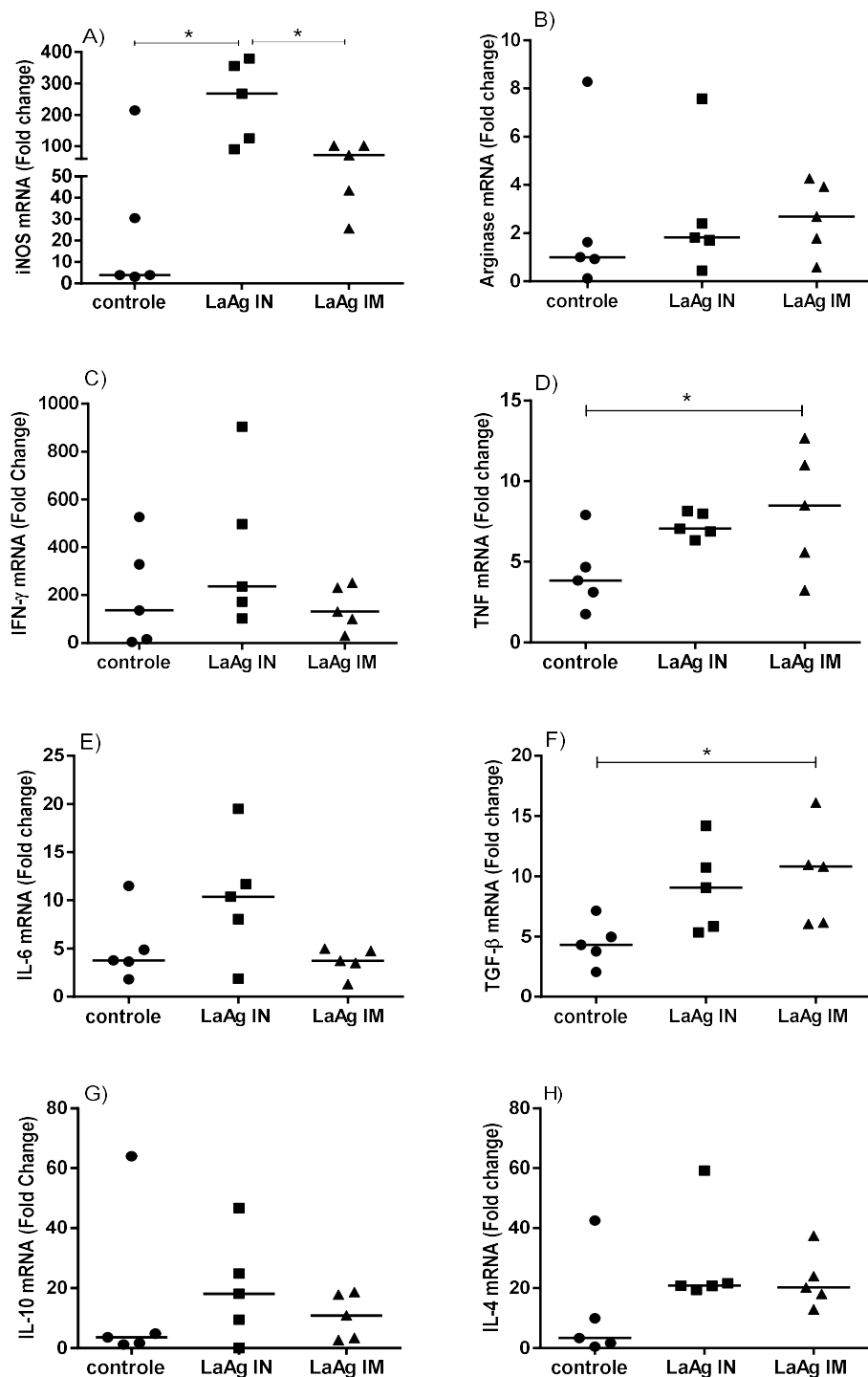


**Figura 6.7. Análise quantitativa dos níveis de Imunoglobulinas anti-*Leishmania*.** Hamsters ( $n=5$  por grupo) foram imunizados por via intranasal com 20  $\mu\text{g}$  LaAg ou por via intramuscular com 20  $\mu\text{g}$  LaAg e infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. O grupo controle foi definido por animais não imunizado. Após 50 dias da infecção, os animais foram eutanasiados e em seguida coletado sangue. O plasma foi obtido para determinar os níveis de IgG e IgG2 anti-*Leishmania*. A) Densidade óptica dos níveis de IgG 50 dias após a infecção. B) Densidade óptica dos níveis de IgG2 50 dias após a infecção. Cada ponto representa um animal e as barras horizontais representam as medianas. \* $p < 0,05$ .

## **6.8. Avaliação da expressão gênica de enzimas e citocinas em fragmento de lesão após 50 dias de infecção por *L. amazonensis*, em hamsters previamente imunizados**

Para determinar o perfil da resposta imune induzida pela vacinação intranasal ou intramuscular com LaAg num momento intermediário do curso evolutivo da lesão causada pela infecção por *L. amazonensis*, foram coletados fragmentos de pata 50 dias após a infecção e realizada a quantificação da expressão gênica das enzimas iNOS e Arginase e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  pelo ensaio de RT qPCR.

No 50° dia após a infecção com *L. amazonensis* foi observado um aumento significativo na expressão gênica de iNOS no grupo LaAg IN (mediana=267,3) quando comparado ao grupo controle (mediana=3,12;  $p < 0,05$ ) e também quando comparado com o grupo LaAg IM (mediana=71,84;  $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença significativa na expressão gênica de iNOS comparando o grupo LaAg IM e o grupo controle (Figura 6.8A). Também, foi observado um aumento significativo na expressão gênica de TNF no grupo LaAg IM (mediana=8,49) quando comparado ao grupo controle (mediana=3,84;  $p < 0,05$ ) (Figura 6.8 D). O mesmo aumento pôde ser visto para a citocina TGF- $\beta$  no grupo LaAg IM (mediana=10,8) quando comparado com o grupo controle (mediana=4,3;  $p < 0,05$ ) (Figura 6.8 F).



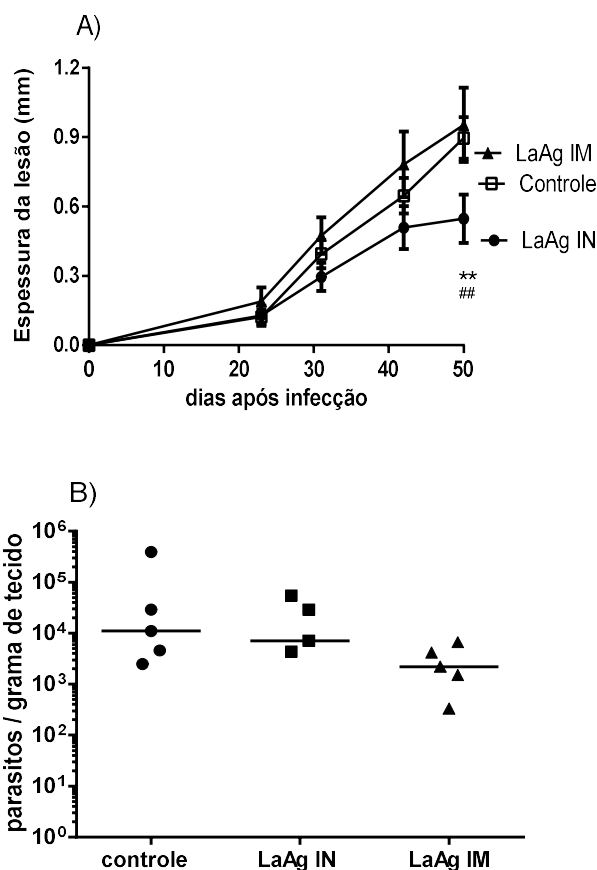
**Figura 6.8.** Expressão gênica de citocinas e enzimas no fragmento de lesão após 50 dias de infecção por *L. amazonensis*, em hamsters previamente imunizados com LaAg por via intranasal ou intramuscular. Hamsters (5 por grupo) foram imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pelas vias intramuscular ou intranasal, seguido de uma segunda dose 14 dias depois. O grupo controle não foi imunizado. Duas semanas após a última dose da vacina, os hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. A análise da expressão gênica no fragmento de pata foi realizada após 50 dias da infecção. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o “fold change” na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \*p < 0,05.

Parâmetros avaliados nos momentos intermediários do curso evolutivo (30 e 50 dias) da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster.

### 6.9. Acompanhamento da lesão e quantificação da carga parasitária

A partir do dia 50 após a infecção com *L. braziliensis* o grupo LaAg IN apresentou uma diminuição significativa no tamanho da lesão (média=0,54 mm) quando comparado com o grupo controle (média=0,89 mm;  $p < 0,01$ ) e com o grupo LaAg IM (média=0,95 mm;  $p < 0,01$ ) (Figura 6.9A). Não foi observada diferença significativa no tamanho das lesões entre o grupo LaAg IM e o grupo controle.

Em relação à carga parasitária desses hamsters ao quinquagésimo dia após infecção, não foram observadas diferenças entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e o grupo controle. (Figura 6.9 B).



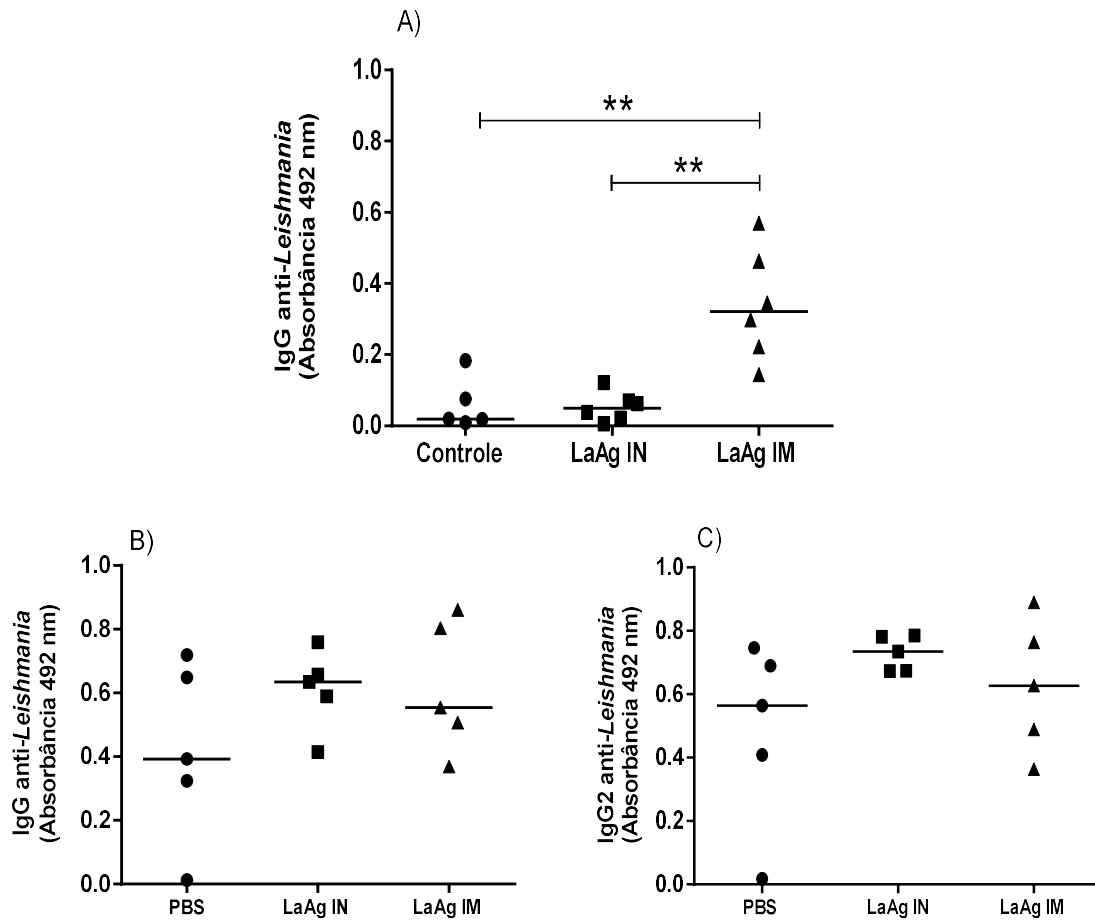
**Figura 6.9 – Avaliação da eficácia protetora após 50 dias de infecção por *L. braziliensis* em animais previamente imunizados por via intranasal ou intramuscular com LaAg.** Hamsters (n=5 por grupo) foram imunizados por via intranasal com 20  $\mu$ g LaAg (LaAg IN) ou pela via intramuscular com 20 $\mu$ g LaAg (LaAg IM) e infectados por via subcutânea no dorso da pata com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*. A) Tamanho da lesão até 50 dias de infecção por *L. braziliensis* B) Carga parasitária da lesão determinada 50 dias após a infecção por *L. braziliensis* pelo método de diluição limitante. O grupo controle foi constituído por animais não vacinados. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal do meio representa a mediana. \*\* e ##  $p < 0,01$ . (\*) indica comparação entre o grupo LaAg IN e o grupo controle e o símbolo (#) indica comparação entre o grupo LaAg IN e o LaAg IM.



### **6.10. Avaliação da produção de Imunoglobulinas (IgG e IgG2) anti-*Leishmania***

Após 30 dias da infecção por *L. braziliensis*, o grupo de hamsters LaAg IM, apresentou um aumento significativo nos níveis de IgG anti-*Leishmania* (absorbância= 0,34) quando comparado com o grupo controle (absorbância=0,01;  $p < 0,01$ ) (Figura 6.10 A). O grupo LaAg IN, apresentou níveis baixos de IgG anti-*Leishmania* e não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Nesta fase da infecção (30 dias) não foi detectado níveis de IgG2 específicos em nenhum dos 3 grupos avaliados.

Com 50 dias de infecção, foi observado um aumento nos níveis de IgG total anti-*Leishmania* nos 3 grupos analisados quando comparado com os níveis no tempo de 30 dias após a infecção, mas não foi observada diferença estatística nos níveis de IgG anti-*Leishmania* entre os grupos neste tempo. Nesta fase da infecção, foi possível detectar níveis de IgG2 nos 3 grupos, mas também não foi observada diferença estatística nos níveis de IgG2 anti-*Leishmania* entre os grupos (Figura 6.10 B e C)



**Figura 6.10 Análise quantitativa dos níveis de Imunoglobulinas por ELISA.** Hamsters (n=5-6 por grupo) foram imunizados por via intranasal com 20 µg LaAg ou por via intramuscular com 20µg LaAg e infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotasde *L. braziliensis*. Controle é o grupo não imunizado. Após 30 e 50 dias da infecção, os animais foram eutanasiados e foi coletado sangue para determinar os níveis de IgG e IgG2 no plasma. A) Densidade óptica dos níveis de IgG 30 dias após a infecção. B) Densidade óptica dos níveis de IgG 50 dias após a infecção. C) Densidade óptica dos níveis de IgG2 50 dias após a infecção. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal do meio representa a mediana. \*\*p < 0,01.

### **6.11. Avaliação da expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento de pata 30 ou 50 dias após a infecção por *L. braziliensis* em animais previamente vacinados**

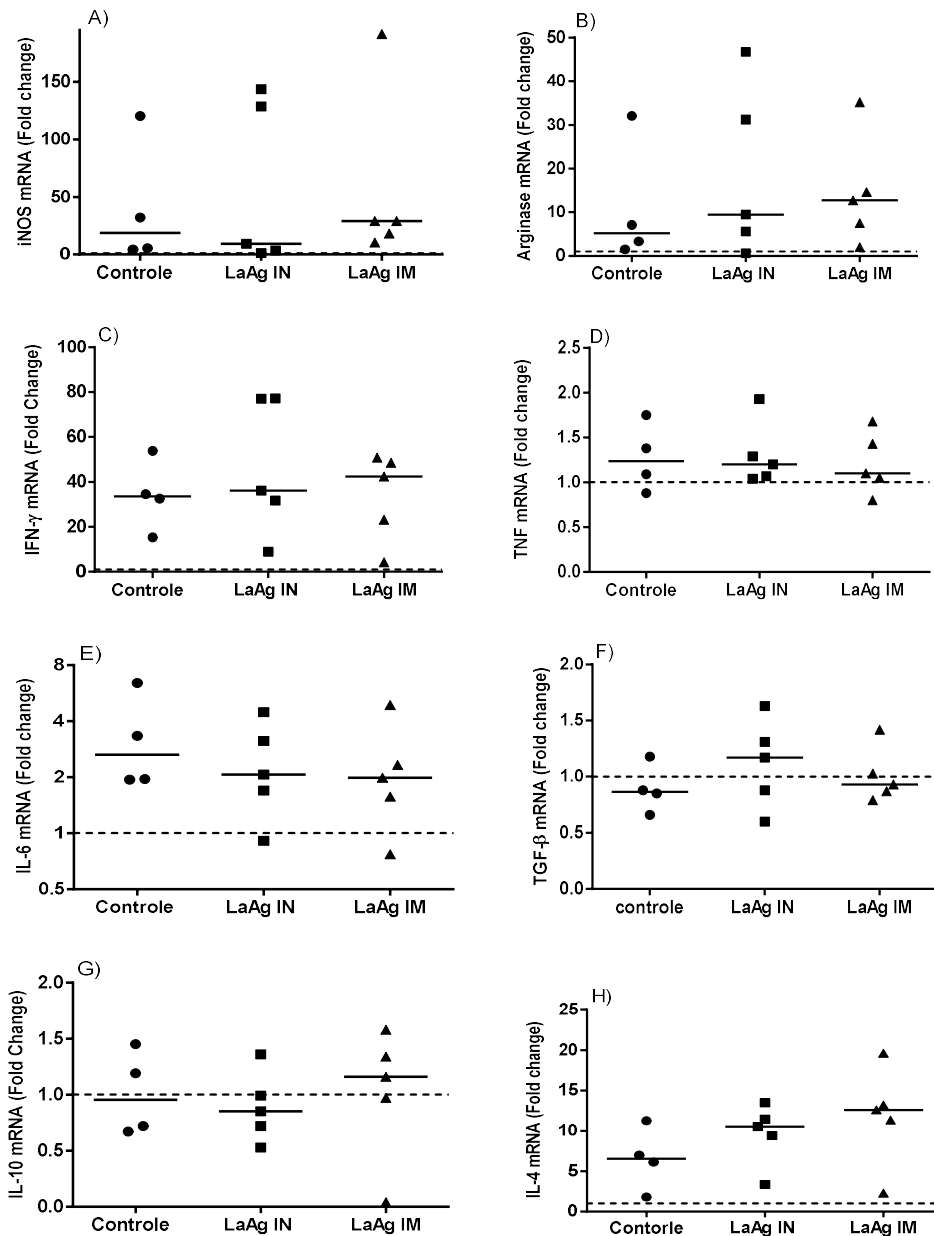
Para determinar o perfil da resposta imune induzida pela vacinação intranasal ou intramuscular com LaAg nos momentos intermediários da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster, foram coletados fragmentos de pata após 30 ou 50 dias de infecção. Em seguida, foi realizada a quantificação da expressão gênica das enzimas iNOS e Arginase, e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  pelo ensaio de RT qPCR.

#### **6.11.1. Expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento de pata 30 dias após infecção por *L. braziliensis***

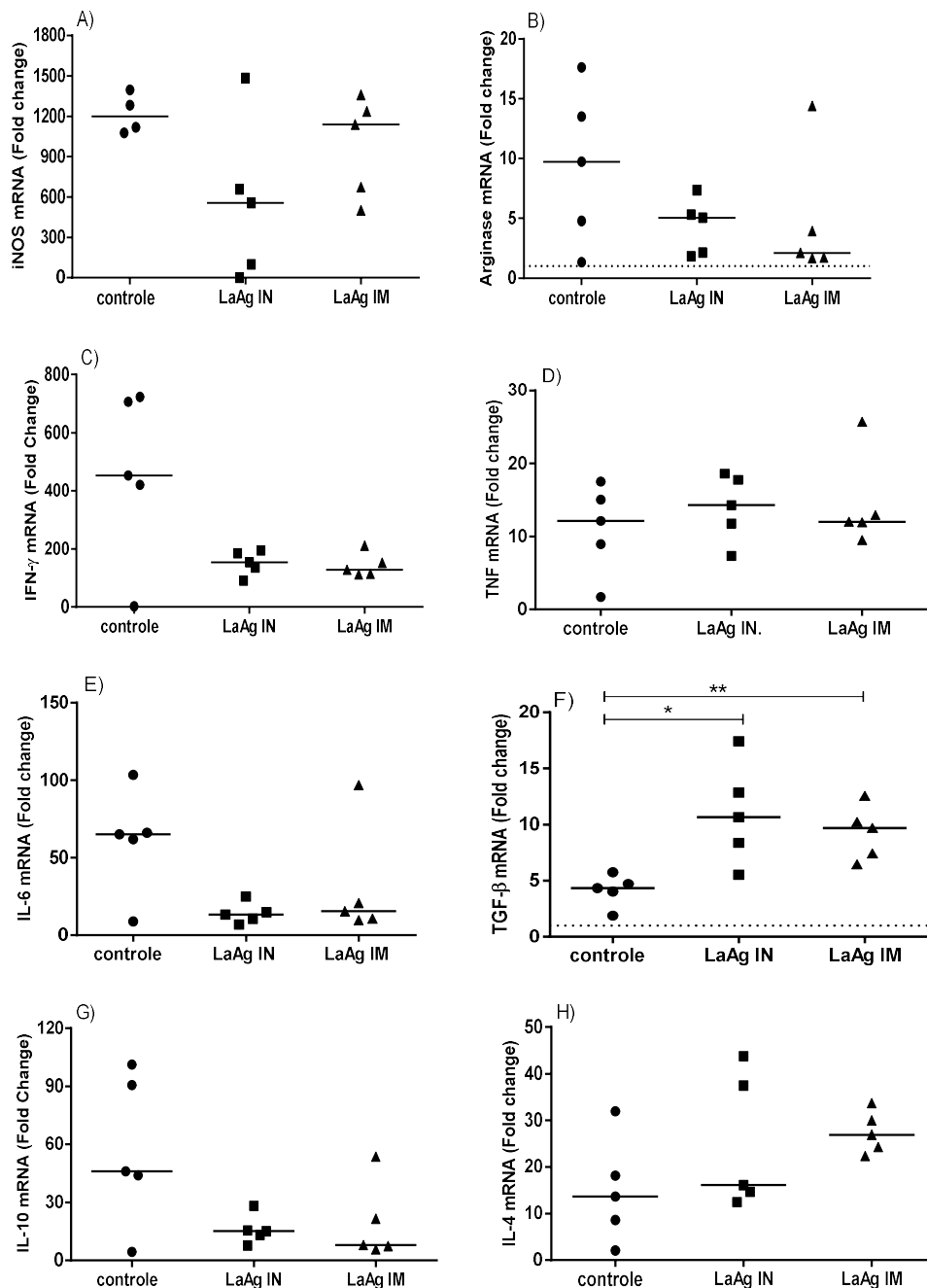
No 30° dia após a infecção, todos os alvos foram amplificados, porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos nessa fase da infecção por *L. braziliensis* (Figura 6.11.1).

#### **6.11.2. Expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento de pata 50 dias após infecção por *L. braziliensis***

No 50° dia após a infecção foi observado um aumento significativo na expressão gênica de TGF- $\beta$  tanto no grupo LaAg IN (mediana=10,66;  $p < 0,05$ ) quanto no grupo imunizado com LaAg IM (mediana=9,7;  $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle (mediana=4,35). Para os demais alvos, não foi observada diferença entre os grupos (Figura 6.11.2).



**Figura 6.11.1** Expressão gênica de mRNA de citocinas e enzimas no fragmento da pata de hamsters imunizados com LaAg por via nasal e intramuscular, 30 dias após infecção por *L. braziliensis*. Hamsters (5 por grupo) foram imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pelas vias intramuscular ou intranasal, seguido de uma segunda dose 14 dias depois. O grupo controle não foi imunizado. Duas semanas após a última dose da vacina, os hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*. A análise da expressão gênica no fragmento de pata foi realizada após 30 dias da infecção. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o “fold change” na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana.



**Figura 6.11.2** Expressão gênica de mRNA de citocinas e enzimas no fragmento da pata de hamsters imunizados com LaAg por via nasal e intramuscular, 50 dias após infecção por *L. braziliensis*. Hamsters (5 por grupo) foram imunizados com 20  $\mu$ g de LaAg pelas vias intramuscular (LaAg IM) ou intranasal (LaAg IN), seguido de uma segunda dose 14 dias depois. O grupo controle não foi imunizado. Duas semanas após a última dose da vacina, os hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*. A análise da expressão gênica no fragmento de pata foi realizada após 50 dias da infecção. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o “fold change” na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

**Objetivo 3. Comparar as alterações dos parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos durante a evolução da infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* no modelo hamster e sua relação com a patogênese da leishmaniose tegumentar humana.**

Muito do que se sabe sobre os mecanismos imunopatogênicos e de imunoproteção na leishmaniose tegumentar foi investigado no modelo murino, sobretudo nas infecções por *L. major* e *L. amazonensis*. Os modelos experimentais BALB/c e C57BL/6 estão associados, respectivamente, a um padrão de susceptibilidade ou resistência à *L. major* tornando-os interessantes para estudar fenômenos de progressão e controle da infecção.

No entanto, o estudo da infecção por espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*), principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas, é limitado pela baixa susceptibilidade dos modelos experimentais murinos à infecção por espécies do subgênero *Viannia*.

Nosso grupo tem estudado nos últimos anos as alterações clínicas e imunopatológicas durante a evolução da infecção por *L. braziliensis* no hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), no sentido de se estabelecer parâmetros laboratoriais que permitam utilizar este modelo para o estudo de patogênese e de proteção vacinal na LTA.

Assim, nesta etapa do trabalho foram comparados os parâmetros clínicos/parasitológicos e imunológicos durante a evolução da infecção por, *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, no modelo hamster, a fim de contribuir para o estabelecimento do uso do hamster dourado como um modelo experimental para estudos que visem compreender os mecanismos relacionados a patogênese da leishmaniose tegumentar humana.

### **Resultados referentes ao Objetivo 3:**

#### **6.12. Avaliação da evolução clínica da lesão em hamsters infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis***

O resultado da análise da evolução clínica após infecção experimental do modelo hamster, tanto para a espécie *L. amazonensis* quanto para *L. braziliensis*, definiu um aspecto progressivo de curso crônico, com o início de aparecimento dos sintomas entre 20 e 30 dias (Figura 6.12A).

O tamanho da lesão da pata após 100 dias de infecção por *L. amazonensis* (mediana = 1,75mm) foi significativamente maior que o tamanho da lesão no tempo de 50 dias (mediana = 0,47mm,  $p < 0,001$ ), representando um aumento de tamanho aproximado em 3,7 vezes em 50 dias de acompanhamento. (Figura 6.12B).

Este aumento significativo no tamanho da lesão no 100º dia (mediana= 2,35mm) também foi observado nos hamsters infectados por *L. braziliensis* quando comparado às lesões no 50º dia (mediana=0,8mm,  $p < 0,01$ ) (Figura 6.12B). Esse aumento foi de aproximadamente 2,9 vezes ao longo de 50 dias de evolução.

Vale destacar que a progressão da lesão com 50 dias ou 100 dias após infecção por *L. braziliensis* tende a ser mais rápida, e resulta em lesões significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparadas com as causadas por *L. amazonensis* (Figura 6.12B)

Vale destacar que a avaliação do tamanho da pata aos 100 dias de acompanhamento de animais infectados por *L. braziliensis* demonstrou uma maior amplitude de variação quando comparado aos outros grupos.

### **Avaliação da carga parasitária da lesão em hamsters infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis***

Ao quantificar a carga parasitária nas lesões dos animais infectados por *L. amazonensis* no 100º dia de infecção não foi observado um aumento significativo ( $7,4 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido) quando comparado aos valores da mediana da carga parasitária no momento de avaliação anterior (50º dia) ( $2,0 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido). Da mesma forma, a evolução clínica da infecção por *L. braziliensis* não refletiu em aumento da carga parasitária avaliada na lesão quando foi comparado os valores do 50º ( $1,1 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido) e 100º dia ( $9,0 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido) pós-infecção (Figura 6.12 C).

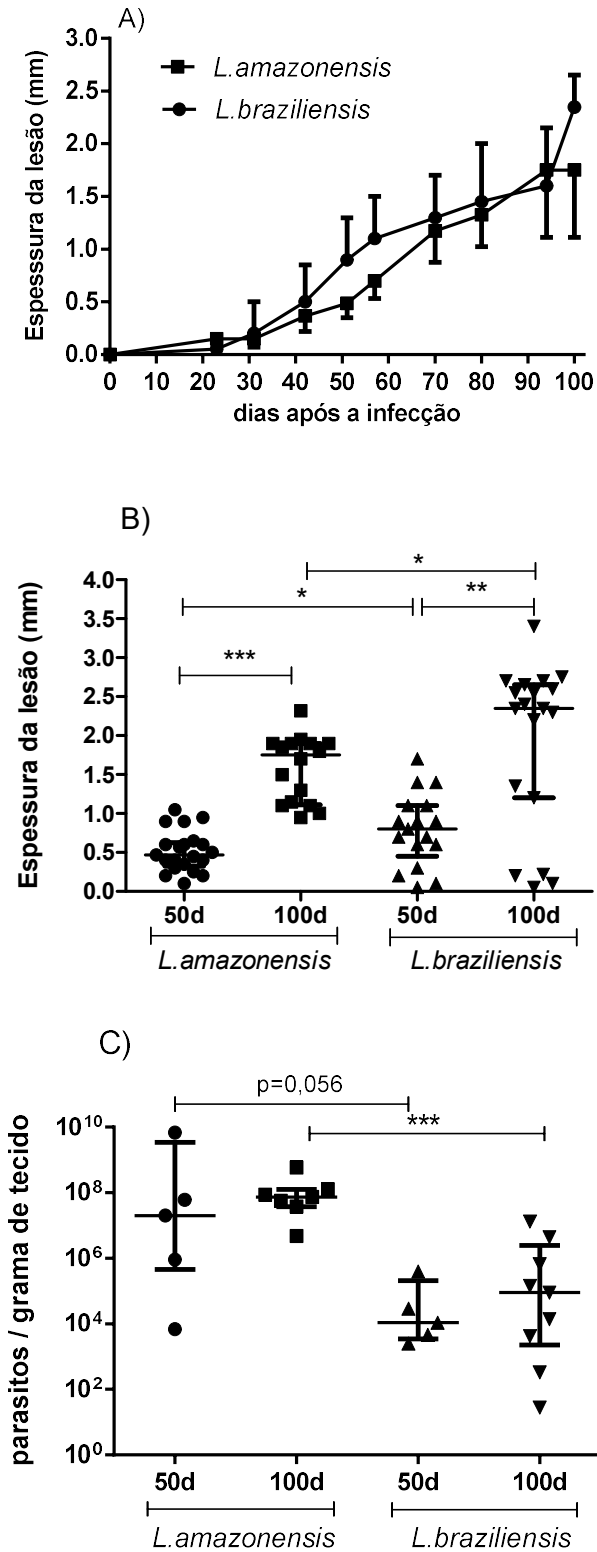
No 50º dia pós-infecção, a quantidade mediana de parasito no tecido foi maior ( $p = 0,056$ , sem significância estatística) nas lesões causadas por *L. amazonensis* ( $2,0 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido) quando comparada as lesões por *L. braziliensis* ( $1,1 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido), considerando o mesmo inóculo de formas promastigotas no momento inicial. No 100º dia pós-infecção, essa diferença foi mais evidente e o grupo infectado por *L. amazonensis* apresentou uma carga parasitária significativamente maior ( $7,4 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido,  $p < 0,0003$ ) comparado ao grupo infectado por *L. braziliensis* ( $9,0 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido) (Fig.6.12 C), Assim, no 100º dia de evolução clínica a

carga parasitária mediana nas lesões causadas por *L. amazonensis* foi 820 vezes maior do que a carga parasitária observada nas lesões causadas por *L. braziliensis* (Figura 6.12C).

### **6.13. Avaliação macroscópica da lesão com 100 dias de evolução em pata de hamsters infectados por *L. amazonensis* ou por *L. braziliensis***

Com o objetivo de ilustrar os aspectos clínicos das lesões na pata de hamsters infectados por *L. amazonensis* ou por *L. braziliensis*, foi feito um registro fotográfico das patas infectadas no centésimo dia de acompanhamento. Quanto ao aspecto macroscópico das lesões foi observado que o grupo de hamsters infectado por *L. amazonensis* apresentou um predomínio de lesões nodulares, porém não ulceradas. Por outro lado, o grupo de hamsters infectados por *L. braziliensis* apresentou predomínio de lesões ulceradas com visível dano tecidual. O quadro abaixo representa o aspecto da lesão das patas de todos os animais de um dos experimentos (Painel 6.13).



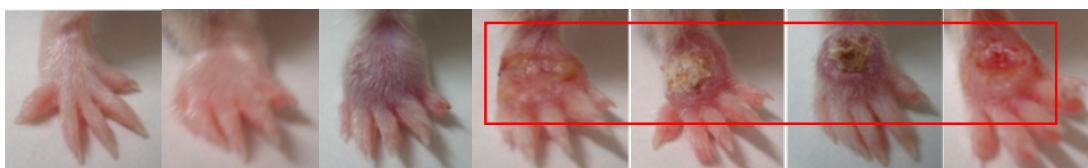


**Figura 6.12 – Comparação das evoluções clínicas pós infecção e da carga parasitária em hamsters infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** A) tamanho da lesão de hamsters infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, B) Gráfico representa o tamanho da lesão da pata de cada animal, de 2 a 3 experimentos independentes, nos tempos de 50 (50d) e 100 (100d) dias após a infecção, totalizando 16 a 21 animais por grupo. C) Carga parasitária na pata quantificada nos tempos de 50 e 100 dias após a infecção pelo método de diluição limitante. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal do meio representa a mediana, e as linhas horizontais inferiores e superiores representam os intervalos interquartis de 25% e 75%, respectivamente. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## ***L. amazonensis***



## ***L. braziliensis***



**Painel 6.13 - Avaliação macroscópica da lesão das patas de hamsters.** Após 100 dias de acompanhamento da infecção, foi feito um registro fotográfico do aspecto clínico das lesões, dos animais infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^5$  *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* no dorso da pata direita.

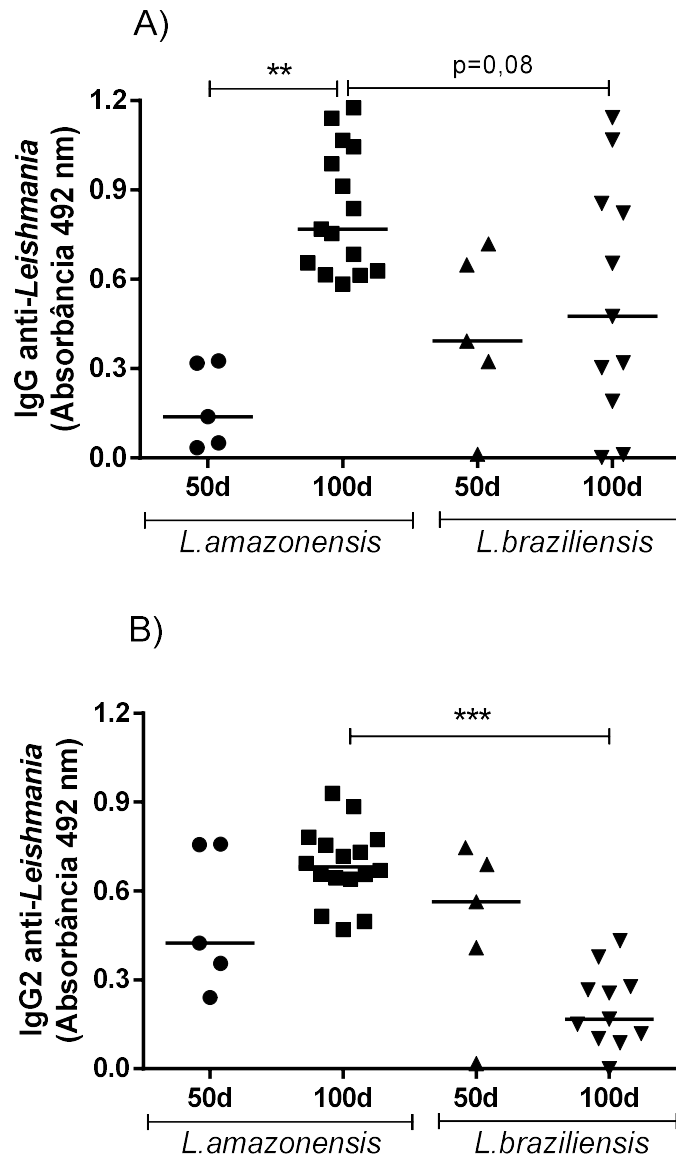
#### **6.14. Avaliação da produção de Imunoglobulinas (IgG e IgG2) anti-*Leishmania***

Dados da literatura em relação ao modelo hamster demonstraram que os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania spp* estão relacionados com a infecção progressiva por *L. panamensis* (Osorio, 2003) e *L. braziliensis* (Da Silva-Couto *et al.* 2015).

Ao realizar a comparação dos níveis de IgG nos tempos de 50 e 100 dias após a infecção por *L. amazonensis* foi observado um aumento significativo nos níveis de IgG no tempo de 100 dias (Absorbância=0,77) comparado com os níveis no tempo de 50 dias (Absorbância=0,14;  $p < 0,01$ ) (Figura 6.14B). Este aumento nos níveis de IgG no 100º dia (Absorbância=0,48) não foi observado nos hamsters infectados por *L. braziliensis* quando comparado aos níveis no 50º dia (Absorbância=0,39) (Figura 6.14A).

Quanto aos níveis de IgG2, não foi observado diferença significativa quando foi feita a comparação dos níveis de IgG2 entre os tempos de 50 e 100 dias após a infecção tanto no grupo de hamsters infectado por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis* (Figura 6.14 B).

No 100º dia pós-infecção, o nível de IgG anti-*Leishmania* foi discretamente maior ( $p = 0,08$  sem significância estatística) no grupo de hamsters infectados por *L. amazonensis* (Absorbância=0,77) quando comparado com os hamsters infectados por *L. braziliensis* (Absorbância=0,48). Essa diferença foi mais evidente ao analisar os níveis de IgG2 anti-*Leishmania*, uma vez que o grupo infectado por *L. amazonensis* apresentou um nível de IgG2 significativamente maior (Absorbância=0,68,  $p < 0,001$ ) comparado ao grupo infectado por *L. braziliensis* (Absorbância=0,17) (Fig.6.14 B).



**Figura 6.14 - Análise quantitativa dos níveis de Imunoglobulinas por ELISA.** Hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* ou com *L. braziliensis*. Após 50 (50d) e 100 (100d) dias da infecção foi coletado sangue para determinar os níveis de IgG e IgG2 anti-*Leishmaniano* plasma. A) Densidade óptica dos níveis de IgG. B) Densidade óptica dos níveis de IgG2. Gráfico representa 1 - 2 experimentos independentes. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.15. Avaliação da cinética da expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento de pata de hamsters infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* nos tempos de 50 e 100 dias após a infecção.

Após 50 dias de infecção por *L. braziliensis*, foi observado um aumento significativo de expressão de iNOS (mediana=1100) quando comparado aos animais infectados por *L. amazonensis* (mediana=3,9;  $p < 0,05$ ) (Figura 6.15A). O mesmo pode ser observado aos 100 dias de infecção por *L. braziliensis* (mediana=562) em relação à infecção por *L. amazonensis* (mediana=109;  $p < 0,001$ ) (Figura 6.15A), o

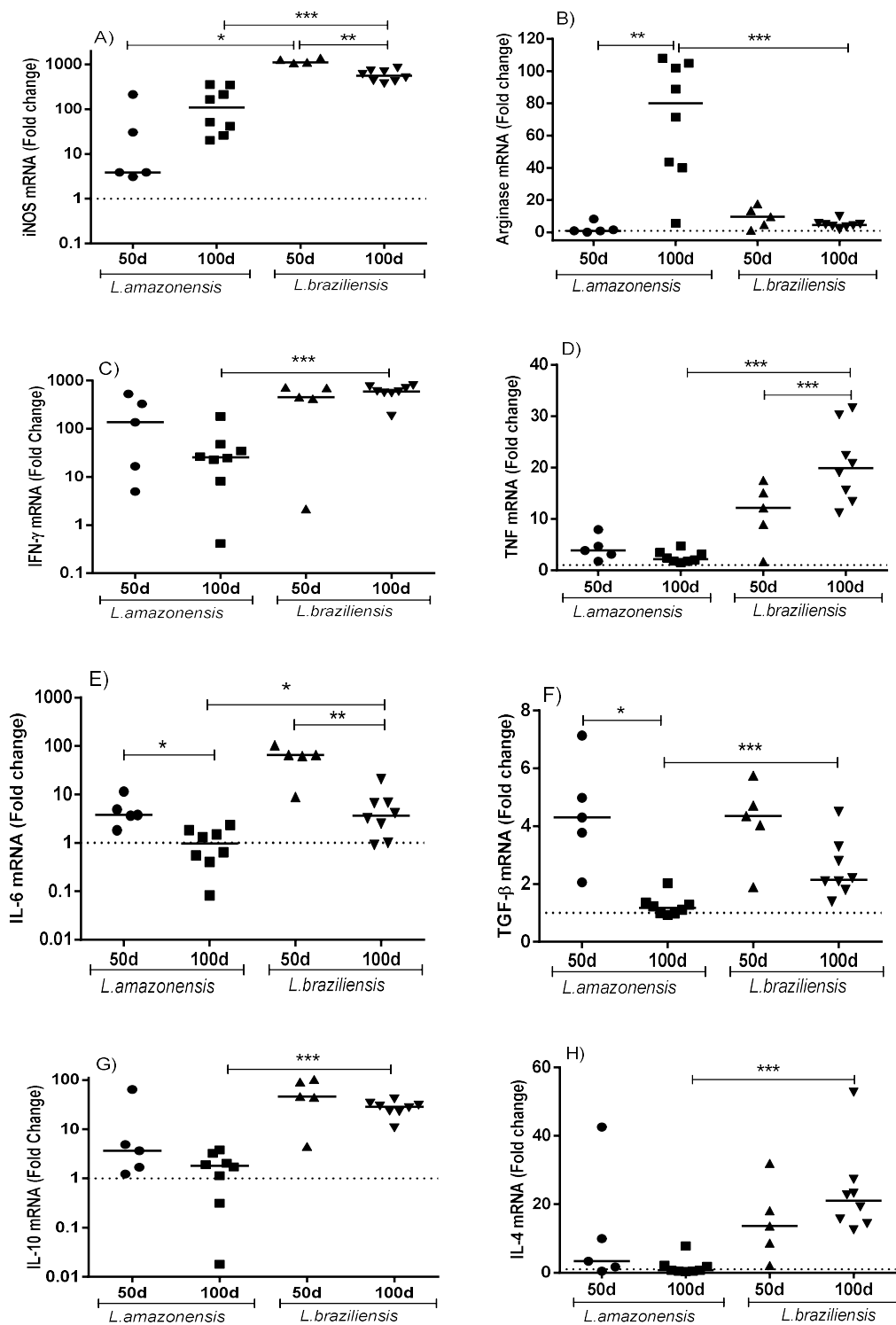
que parece estar correlato com a menor carga parasitária observada nos animais infectados por *L. braziliensis*.

O aumento significativo de expressão de arginase após 100 dias de infecção por *L. amazonensis* (mediana=80) em relação ao 50º dia (mediana=1,0  $p < 0,01$ ) (Figura 6.15B), parece ter relação direta com o aumento de carga parasitária demonstrada nessa condição experimental.

Aos 100 dias de infecção, foi observado um importante aumento de expressão de IFN-  $\gamma$  nos animais infectados com *L. braziliensis* (mediana=591) em comparação aos animais infectados por *L. amazonensis* (fold change=25,5;  $p < 0,001$ ) (Figura 6.15C), sustentando a ideia de que nesses animais infectados por *L. braziliensis* existe um perfil Th1 em evidência responsável pelo controle da carga parasitária.

O aumento da expressão gênica de TNF após 100 dias de infecção por *L. braziliensis* (mediana=19,9) em relação ao 50º dia de infecção (mediana=12,1;  $p < 0,05$ ) e o aumento de expressão de TNF, aos 100 dias da infecção por *L. braziliensis* (mediana=19,9) em comparação aos animais infectados por *L. amazonensis* (mediana=2,2;  $p < 0,001$ ) (Figura 6.15D) sugerem um processo inflamatório mais acentuado nas lesões causadas por *L. braziliensis*, o que justifica o dano tecidual, o aspecto ulcerado e o maior tamanho das lesões. Pelo menos em parte, o aumento da condição inflamatória parece estar associada com a capacidade microbicida. Nesse contexto, o mesmo fenômeno foi observado para a expressão da citocina inflamatória IL-6 que foi significativamente maior aos 100 dias de infecção por *L. braziliensis* (mediana= 3,65) quando comparado a infecção por *L. amazonensis* (mediana= 0,97;  $p < 0,05$ ) (Figura 6.15 E)

Para as demais citocinas como TGFB, IL-10 e IL-4 existe um padrão de aumento de expressões gênicas nas infecções por *L. braziliensis*, sobretudo nas infecções de 100 dias de evolução, em relação aos animais infectados por *L. amazonensis*.



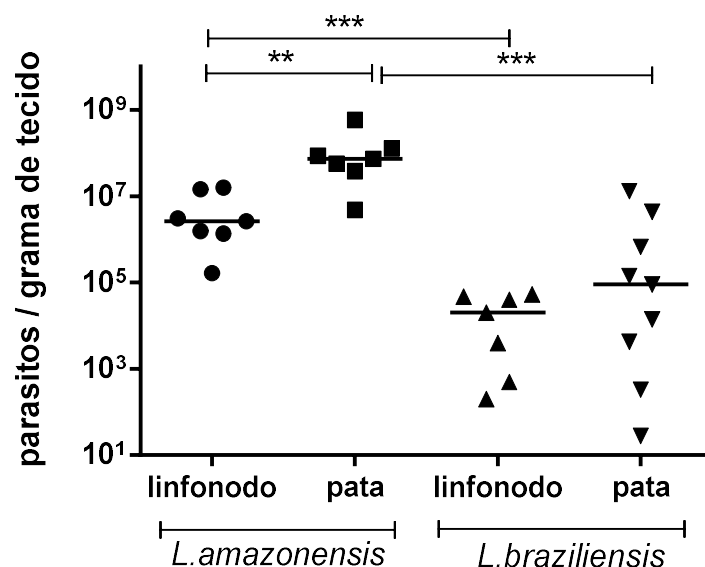
**Figura 6.15. Comparação da expressão gênica de mRNA de citocinas e enzimas na pata de hamsters infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** Hamsters (5-8 por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* ou com *L. braziliensis*. A análise da expressão gênica na pata foi realizada após 50 (50d) e 100 (100d) dias da infecção por RTqPCR. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o “fold change” na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

#### **6.16. Quantificação da carga parasitária na pata e no linfonodo de hamsters após 100 dias de infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.**

Com o objetivo de investigar as diferenças nos parâmetros parasitológicos e imunológicos no sítio de infecção (pata) e no linfonodo drenante da lesão de hamsters infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi avaliada a relação entre a carga parasitaria e a expressão gênica de enzimas e citocinas por RTqPCR no final do acompanhamento da lesão (100 dias após a infecção)

Em hamsters após 100 dias de infecção por *L. amazonensis* foi observado que a carga parasitária no fragmento de lesão foi significativamente maior ( $7,4 \times 10^7$  parasitos/grama de tecido) quando comparada com a carga parasitária no linfonodo poplíteo ( $2,6 \times 10^6$  parasitos/grama de tecido;  $p < 0,0023$ ). Enquanto isso, no grupo de hamsters infectado por *L. braziliensis* não foi observada diferença significativa entre a carga parasitária quantificada na pata e no linfonodo poplíteo (Figura 6.16).

O linfonodo drenante da lesão causada por *L. amazonensis* apresentou uma carga parasitária significativamente maior ( $260 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido), quando comparado com a carga parasitária no linfonododo grupo infectado por *L. braziliensis* ( $2,0 \times 10^4$  parasitos/grama de tecido;  $p < 0,0006$ ) (Figura 6.16).



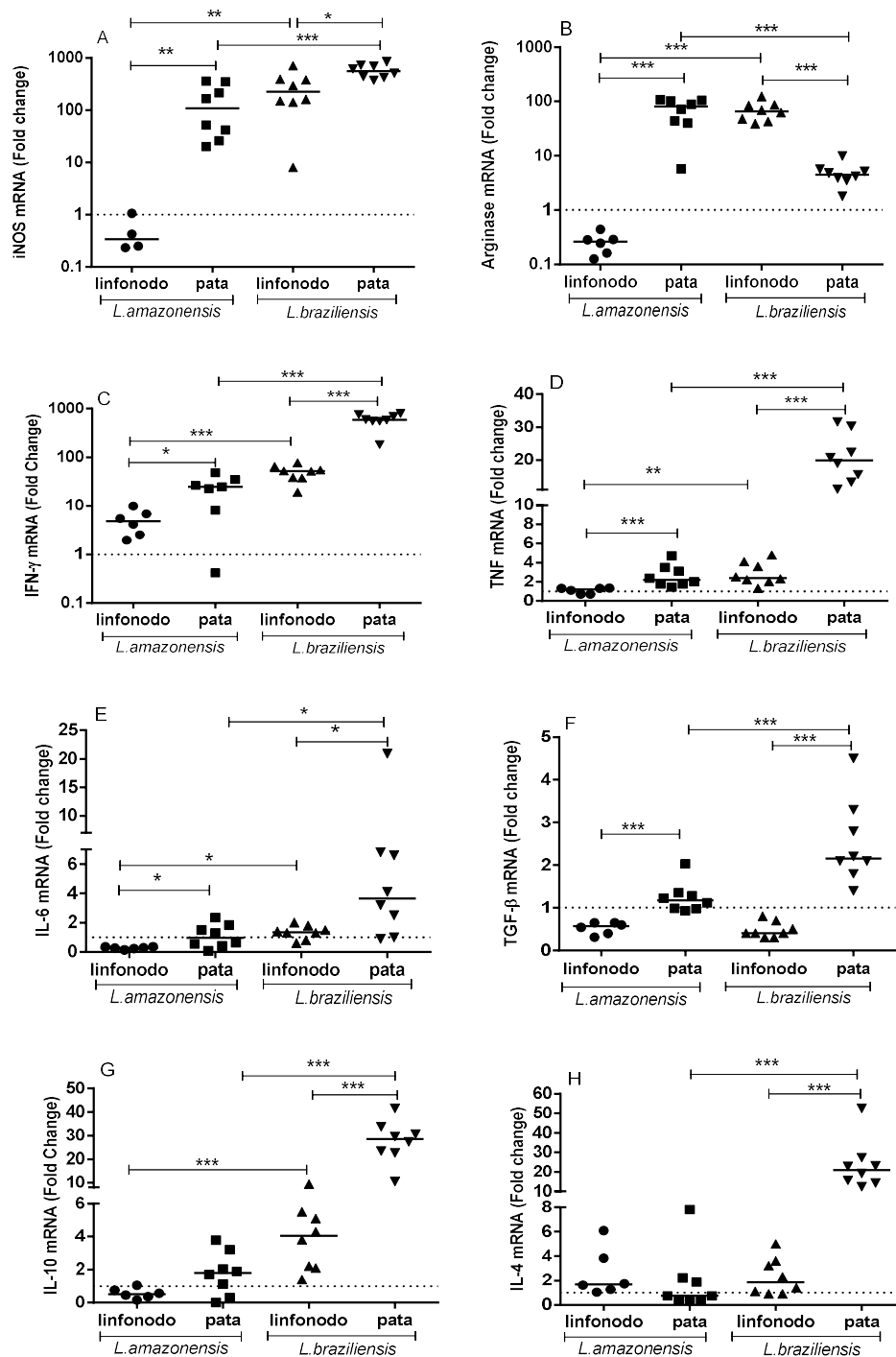
**Figura 6.16 – Quantificação da carga parasitária na pata e no linfonodo após 100 dias de infecção com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** Hamsters foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. A carga parasitária na pata e no linfonodo poplíteo foi quantificada 100 dias após a infecção pelo método de diluição limitante. Cada ponto representa um animal. A linha horizontal representa a mediana. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.17. Avaliação da expressão gênica de enzimas e citocinas no fragmento depata e no linfonodo poplíteo de hamsters após 100 dias de infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*

No linfonodo de hamsters infectados por *L. amazonensis* foi observado que a expressão gênica de todas as enzimas (iNOS e Arginase) e citocinas como TNF, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4, ficaram abaixo ou bem próxima do calibrador (Figura 6.17). O fato de uma alta carga parasitária não ser capaz de alterar o padrão de expressão de moléculas importantes na indução de uma resposta microbicida, nos leva a pensar que a espécie *L. amazonensis* possui mecanismos de regulação da resposta imune que favorece a proliferação parasitária e a disseminação do mesmo pela via linfática.

Além disso, foi observado que a expressão das enzimas iNOS e arginase e das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10 no linfonodo do grupo de hamsters infectado por *L. braziliensis* foi significativamente maior que no grupo infectado por *L. amazonensis* (Fig. 6.17A, B, C, D, E, G) Isso sugere que a infecção por *L. braziliensis* permite que o sistema imune do hamster consiga perceber e ativar mecanismos que estão associados com o aumento da capacidade microbicida e de contenção das formas parasitárias.





**Figura 6.17. Expressão gênica de mRNA de citocinas e enzimas na pata e no linfonodo poplíteo de hamsters infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** Hamsters (6-8 por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. A análise da expressão gênica na pata e no linfonodo poplíteo foi realizada após 100 dias da infecção por RTqPCR. (A) iNOS (B) Arginase (C) IFN- $\gamma$  (D) TNF (E) IL-6 (F) TGF- $\beta$  (G) IL-10 (H) IL-4. Símbolos representam o "fold change" na expressão de mRNA em relação a expressão de mRNA em amostras de pele de hamsters não infectados (calibradores da reação) e que estão representados pela linha tracejada. Cada ponto representa um animal. A barra horizontal representa os valores de mediana. \*p < 0,05 \*\* p < 0,001 \*\*\*p < 0,001.

## 7. Discussão

A maioria dos estudos com o objetivo de investigar os mecanismos imunopatogênicos e desenvolver uma vacina eficaz contra a infecção por espécies dermatrópicas de *Leishmania* é realizada no modelo murino de infecção, sobretudo por *L. major* e *L. amazonensis*.

Já os estudos relativos à infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (por exemplo: *L. braziliensis* ou *L. guyanensis*), principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas (LTA), têm sido negligenciados pela falta de um modelo experimental que reproduzisse aspectos patológicos e a resposta imunológica observada na doença humana. As cepas de camundongos que se infectam, por exemplo, pela *L. braziliensis* desenvolvem um quadro clínico frustrante e de curso benigno, não reproduzindo os aspectos mais característicos da LTA (DeKrey *et al.* 1998; Rocha *et al.* 2007; Soong *et al.* 2012).

Entretanto, dados da literatura têm demonstrado que o modelo hamster se apresenta altamente susceptível à infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, e que durante o curso da infecção, alguns aspectos clínicos da doença são diversificados. Pelo menos em parte, as características individuais de cada animal (*outbred*) explicam a variabilidade das manifestações clínicas, o que reproduz, nas devidas proporções, muitos dos aspectos clínicos e imunopatológicos observados na doença humana. Historicamente o modelo hamster já vem sendo muito utilizado como modelo para a leishmaniose visceral. Dessa forma, esse modelo experimental tem sido sugerido como muito apropriado para estudos que envolvam a interação de espécies de *Leishmania* com o hospedeiro susceptível (Hommel *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 2004; Gomes-Silva *et al.* 2013; Ribeiro-Romão *et al.* 2014, Mears *et al.* 2015).

Apesar do uso crescente do modelo hamster para estudo de várias doenças, a falta de anticorpos monoclonais específicos para moléculas associadas ao sistema imune torna-se um fator limitante para a utilização desse animal experimental em estudos que requerem a definição de parâmetros imunológicos, como por exemplo, a dosagem de citocinas e a fenotipagem de células do sistema imune (Safronetz *et al.* 2009; Safronetz *et al.* 2012; Ebihara *et al.* 2013; Ribeiro –Romão *et al.* 2014). Isso tem limitado a sua utilização, por exemplo, em pesquisas de desenvolvimento de vacinas, na determinação de correlatos de proteção ou imunopatogênese de doenças, ou seja, onde a caracterização do tipo de resposta imune gerada é fundamental para a compreensão do mecanismo envolvido.

Atualmente as ferramentas disponíveis para ensaios imunológicos em hamsters são qRT-PCR para a detecção de expressão de genes relacionados com imunidade e ELISA para a detecção de respostas imunes humorais mediada por anticorpos (Warner *et al.* 2016).

Nesse sentido, nosso grupo tem estudado nos últimos anos as alterações clínicas e imunopatogênicas durante a evolução da infecção por *L. braziliensis* no hamster dourado (Gomes-Silva *et al.* 2013 e Ribeiro-Romão *et al.* 2014). Recentemente nosso grupo padronizou um ensaio de PCR em Tempo Real para quantificação da expressão gênica por RT-qPCR das citocinas IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-6, e das enzimas arginase e iNOS, utilizando o sistema SYBR Green<sup>®</sup> de detecção, em pele e linfonodo de hamsters infectados por *L. braziliensis*. (Ribeiro-Romão *et al.* 2016). O estabelecimento destas técnicas visa permitir ao grupo investigar os mecanismos imunes envolvidos na imunoproteção induzida por candidatos vacinais e na imunopatogênese da leishmaniose.

Nos estudos de imunoproteção, muitos candidatos vacinais são descritos como capazes de gerar uma imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania*, alguns com resultados satisfatórios, porém, as vacinas licenciadas estão restritas ao uso veterinário contra a LV canina. Na busca de uma vacina contra a LTA, a vacina com antígenos totais de *L. amazonensis* (Leishvacin<sup>®</sup>), foi aprovada nos testes clínicos de segurança e imunogenicidade (fase 1 e fase 2) em voluntários humanos após administração parenteral (Marzochi *et al.* 1998, De Luca *et al.* 1999). Entretanto, no teste de eficácia (fase 3) não protegeu indivíduos contra a infecção com espécies do subgênero *Viannia* (Vélez *et al.* 2005).

Dados da literatura demonstram que a imunidade protetora induzida por antígenos totais de *Leishmania* no modelo murino é criticamente dependente da via de imunização. Foi demonstrado que a imunização subcutânea e intramuscular com antígenos totais (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis* – LaAg) promove agravamento da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c (Pinto *et al.* 2003; Pinheiro *et al.* 2005). Estes dados corroboram com estudos em primatas, em que macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) vacinados pela via subcutânea com antígenos de *L. amazonensis* (equivalente ao LaAg) antes da infecção, desenvolveram uma lesão cutânea mais exacerbada que os controles não vacinados (Kenney *et al.* 1999). Estes resultados indicam que promastigotas de *L. amazonensis* mortos contêm antígenos indutores de doença, e levantam o questionamento sobre a possibilidade da vacina, testada há vários anos em

humanos, que é composta de promastigotas de *L. amazonensis* (Leishvacin®) e administrada por via subcutânea ou intramuscular, poder potencializar a infecção em indivíduos mais susceptíveis.

Por outro lado, resultados anteriores no modelo murino demonstraram que quando este mesmo candidato vacinal (LaAg) foi administrado pelas vias de mucosa oral e nasal, foi capaz de promover uma resposta imunoprotetora, sendo demonstrada de forma inédita a eficácia do uso de vias não injetáveis na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6 (Pinto *et al.* 2003; Pinto *et al.* 2004; Pratti *et al.* 2016). Em estudos recentes, nosso grupo demonstrou a eficácia protetora da imunização intranasal com LaAg contra a infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster dourado (Da Silva-Couto *et al.* 2015).

A partir desses resultados, foi desenvolvido o estudo apresentado nessa tese no qual foi avaliada inicialmente se a eficácia protetora da vacinação intranasal com LaAg contra a infecção por *L. amazonensis*, já demonstrada no modelo murino, pode ser estendida ao modelo experimental hamster.

A imunidade protetora contra a infecção por *L. amazonensis* que foi induzida por LaAg foi claramente dependente da via de imunização, uma vez que nos animais imunizados com LaAg pela via intranasal foi observado um retardo no desenvolvimento da lesão, acompanhado da diminuição da carga parasitária na lesão (local da infecção) e no linfonodo drenante quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, a imunização com a mesma concentração e número de doses de LaAg pela via intramuscular, promoveu uma exacerbação da lesão, somado a uma manutenção da carga parasitária semelhante ao grupo controle não imunizado. Estes resultados corroboram com o que foi descrito anteriormente no modelo murino de infecção com *L. amazonensis* (Pinto *et al.* 2004; Pinheiro *et al.* 2005). Este efeito não protetor da vacinação com LaAg pelas vias convencionais (intramuscular ou subcutânea) pode explicar a falha da vacinação com a Leishvacin® nos ensaios clínicos em voluntários humanos (Vélez *et al.* 2005).

A partir da análise de expressão gênica de enzimas através da técnica de RT qPCR pôde-se observar um aumento significativo da expressão de arginase e uma baixa expressão de iNOS em fragmento de lesão proveniente de animais do grupo LaAg IM. Estes animais apresentaram agravamento da lesão e manutenção de alta carga parasitária. A função da arginase no macrófago é converter a L-arginina em ornitina, que favorece a sobrevivência e a proliferação de *Leishmania*. Por outro lado, a expressão de iNOS converte a L-arginina em espécies reativas de

oxigênio que em altas concentrações nos vacúolos fagolisossômicos de macrófago levam a morte dos parasitas (Muxel *et al.* 2017).

A citocina IL4 também foi detectada em níveis de expressão mais elevados na lesão de animais previamente imunizados com LaAg IM. Esta citocina possui função biológica de induzir uma resposta imune do tipo 2 (Th2), que resulta em uma resposta imune preferencialmente mediada por anticorpos com troca de isotipo para IgE, em vez de uma resposta mediada por células capazes de induzir funções microbicias de controle da *Leishmania*. Do mesmo modo, nas lesões de animais imunizados com LaAg IM foram detectados níveis mais elevados de IL10. Essa citocina regulatória age de forma a suprimir resposta efetoras de células como a ativação de macrófagos, que é extremamente importante no controle da carga parasitária.

Embora as análises de expressão gênica ao final de 100 dias após infecção tenham sugerido possíveis padrões que justifiquem uma maior gravidade da lesão observada no grupo LaAg IM, não foi possível observar algum padrão de expressão gênica associado a proteção vacinal observada no grupo LaAg IN. O estudo da modulação da resposta imune nas fases mais iniciais da infecção tem sido proposto como uma estratégia de identificação de padrões de resposta imune correlacionados com o desfecho de uma infecção (Hoft & Eickhoff 2002).

Assim, a partir dos resultados obtidos no final do acompanhamento da infecção (100 dias) por *L. amazonensis* e anteriormente no acompanhamento da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster (Da Silva-Couto *et al.* 2015), buscamos investigar as alterações clínicas e a modulação da resposta imune induzidas pela vacinação intranasal e intramuscular com LaAg nos momentos iniciais e intermediários (5, 30 e 50 dias) da infecção com o objetivo de caracterizar padrões de expressão gênica associados com a resposta protetora observada nos animais do grupo LaAg IN.

Nos hamsters infectados por *L. amazonensis* as análises dos parâmetros, foram realizadas no tempo de 50 dias após a infecção, pois foi o tempo onde as diferenças na espessura das lesões entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e o grupo controle começaram a ser significativas.

Neste tempo de 50 dias após a infecção por *L. amazonensis*, o grupo LaAg IN apresentou uma diminuição significativa no tamanho da lesão quando comparado com o grupo controle e com o grupo LaAg IM. Nesta fase intermediária

da infecção, não houve diferença na carga parasitária entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e controle.

As imunoglobulinas vêm sendo descritas como um importante biomarcador nas leishmanioses, considerando que altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, estão associados a gravidade da doença. No modelo hamster de infecção por *L. panamensis* (Osorio *et al.* 2003) e *L. braziliensis* (Gomes-Silva *et al.* 2013, Ribeiro-Romão *et al.* 2013), altos níveis de IgG anti-*Leishmania* foram associados ao tamanho e a gravidade da lesão.

Aos 50 dias de evolução da infecção por *L. amazonensis*, a presença de maiores títulos de IgG anti-*Leishmania* no grupo LaAg IM pode ser um parâmetro preditor de um prognóstico desfavorável de evolução da doença com 100 dias de evolução quando foi observado as lesões mais graves e as maiores cargas parasitárias.

Aos 50 dias de infecção por *L. amazonensis*, uma expressão gênica mais elevada de iNOS detectada em fragmento de tecido do local da infecção em animais do grupo LaAg IN pode ter relação como desfecho clínico favorável após 100 dias de evolução clínica, quando esses animais apresentaram os menores tamanho de lesão e as menores cargas parasitárias.

Também, aos 50 dias de evolução da infecção por *L. amazonensis* em fragmento de pele obtida do local de infecção de hamster previamente imunizados com LaAg IM, foram observadas maiores expressões de fatores inflamatórios como TNF e fatores regulatórios como TGF- $\beta$ , que poderiam compor um padrão de resposta imune associado com um desfecho desfavorável quanto a gravidade das lesões e elevada carga parasitária observados ao final de 100 dias de infecção.

Nos hamsters infectados por *L. braziliensis*, com o objetivo de avaliar a modulação da resposta imune nos momentos mais iniciais da infecção, as análises inicialmente foram realizadas no 5º dia após a infecção. No entanto nesta fase inicial da infecção, a expressão gênica de todos os alvos analisados, independente do grupo experimental, se apresentou com valores praticamente idênticos aos valores do calibrador da reação (tecido de animal não infectado).

A partir deste resultado, foram avaliados os parâmetros clínicos e imunológicos nos tempos intermediários de 30 dias após a infecção, por ser o tempo onde se começa a observar o aparecimento das lesões nos diferentes grupos, e no tempo de 50 dias após a infecção, por ser o tempo onde as diferenças no tamanho

da lesão entre o grupo LaAg IN se mostraram significativas quando comparadas ao grupo controle e ao grupo LaAg IM.

No tempo de 30 dias após a infecção, não foi observada nenhuma diferença no tamanho da lesão entre os grupos. Somente no tempo de 50 dias após a infecção por *L. braziliensis*, o grupo LaAg IN apresentou uma diminuição significativa no tamanho da lesão quando comparado com o grupo controle e com o grupo LaAg IM. Nesta fase intermediária da infecção (50 dias) não houve diferença na carga parasitária entre os grupos LaAg IN, LaAg IM e controle.

Em relação aos níveis de imunoglobulinas, após 30 dias da infecção por *L. braziliensis*, o grupo de hamsters LaAg IM, apresentou um aumento significativo nos níveis de IgG anti-*Leishmania* quando comparado com o grupo controle e no tempo de 50 dias após a infecção, não foi observada diferença nos níveis de IgG e IgG2 entre os grupos.

Quanto à expressão de enzimas, no tempo de 30 dias após a infecção com *L. braziliensis*, foi detectado níveis baixos na expressão gênica e não foi observada diferença na modulação da expressão gênica das citocinas induzida pela imunização com LaAg pelas vias intranasal e intramuscular e o grupo controle.

No tempo de 50 dias após a infecção por *L. braziliensis*, foi observado um aumento nos níveis da expressão gênica das citocinas independente do perfil (tipo 1 ou tipo 2), quando comparado com os níveis detectados no tempo de 30 dias após a infecção, porém, não foi observada diferença na modulação da expressão gênica das citocinas induzida pela imunização com LaAg pelas vias intranasal e intramuscular e o grupo controle nesta fase da infecção.

Com as análises realizadas nesse estudo das fases iniciais e intermediárias da infecção (5, 30 e 50 dias), não foi possível definir o mecanismo envolvido na imunoproteção induzida pelo protótipo vacinal LaAg pela via intranasal contra infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Com isso, outros estudos devem ser realizados com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos em diferentes etapas da infecção que antecedem a fase crônica numa tentativa de elucidar esses fenômenos.

Como as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são as principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas (LTA), além da *L. guyanensis*, nessa tese também foram comparadas as alterações clínicas e imunopatogênicas durante a evolução da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* no modelo hamster.

Nossos resultados demonstraram que no modelo hamster de infecção, tanto para a espécie *L. amazonensis* quanto para *L. braziliensis*, considerando o mesmo inóculo de formas promastigotas no momento inicial, as lesões se apresentaram com um aspecto progressivo de curso crônico. No entanto, a evolução clínica das lesões nos hamsters infectados tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis* não refletiu em aumento da carga parasitária, que se manteve estável nos dois tempos analisados (50 e 100 dias).

Outro destaque foi a relação oposta entre o tamanho da lesão e a carga parasitária quando foram comparados os hamsters infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. As lesões dos hamsters infectados por *L. amazonensis*, eram significativamente menores que as lesões dos hamsters infectados por *L. braziliensis* tanto no 50º quanto no 100º dia pós-infecção. Por outro lado, no 50º dia pós-infecção, a quantidade de parasito na pata, apresentou uma tendência a ser maior ( $p=0,056$ ) nas lesões causadas por *L. amazonensis* quando comparada as lesões por *L. braziliensis* e no 100º dia pós-infecção, essa diferença foi mais evidente e o grupo infectado por *L. amazonensis* apresentou uma carga parasitária cerca de 820 vezes maior que a carga parasitária observada nas lesões causadas por *L. braziliensis*.

Ao realizar a comparação dos níveis de IgG nos tempos de 50 e 100 dias após a infecção por *L. amazonensis*, foi observado um aumento significativo nos níveis de IgG no tempo de 100 dias comparado com os níveis no tempo de 50 dias. Nos hamsters infectados por *L. amazonensis*, esse aumento nos níveis de IgG com o tempo é acompanhado do aumento do tamanho da lesão e da carga parasitária na pata. O aumento nos níveis de IgG no 100º dia não foi observado nos hamsters infectados por *L. braziliensis* quando comparado aos níveis no 50º dia.

No 100º dia pós-infecção, o nível de IgG anti-*Leishmania* apresentou uma tendência a ser maior ( $p=0,08$ ) no grupo de hamsters infectados por *L. amazonensis* quando comparado com os hamsters infectados por *L. braziliensis*. Ao analisar os níveis de IgG2 anti-*Leishmania*, essa diferença foi mais evidente, uma vez que o grupo infectado por *L. amazonensis* apresentou um nível de IgG2 significativamente maior comparado ao grupo infectado por *L. braziliensis*.

Pacientes infectados com *L. amazonensis* habitualmente apresentam títulos de anticorpos específicos mais altos do que os infectados com *L. braziliensis* (Silveira *et. al* 1998, Silveira *et. al* 2004). Dados da literatura descrevem a importância do perfil de produção de classes e subclasses de imunoglobulinas anti-



*Leishmania* durante a doença ativa e após a cura da LTA em humanos (Gomes-Silva *et al.* 2008; Castellano *et al.* 2009). Na LTA humana há uma concentração de anticorpos específicos aos antígenos de *Leishmania* proporcional à carga parasitária e ao tempo de exposição ao estímulo antigênico (Gomes-Silva 2011).

Quanto aos aspectos das lesões no tempo final do acompanhamento da lesão (100 dias), foi observado que o grupo infectado com *L. amazonensis* apresenta um predomínio de lesões nodulares, não ulceradas e o grupo infectado com *L. braziliensis* apresenta o predomínio de lesões ulceradas, com visível dano tecidual. Uma possível explicação para a magnitude do dano tecidual seria o perfil das citocinas presentes nas lesões. Trabalhos prévios em humanos com leishmaniose cutânea localizada, causadas por *L. braziliensis*, relacionou lesões mais graves com maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF (Antonelli *et al.* 2005).

Quanto ao perfil de expressão gênica de citocinas e enzimas, foi observado um aumento significativo de expressão de iNOS nos hamsters infectados por *L. braziliensis*, quando comparado aos hamsters infectados por *L. amazonensis*, o que parece estar refletindo na baixa carga parasitária observada naqueles animais. Além disso, também foi observado um aumento de expressão de IFN- $\gamma$  nos animais infectados com *L. braziliensis* em comparação aos animais infectados por *L. amazonensis*, sustentando a ideia de que nesses animais infectados por *L. braziliensis* existe um perfil Th1 em evidência, responsável pelo controle da carga parasitária. O aumento de expressão de TNF sugere um processo inflamatório intenso nessas lesões, com um intenso influxo de células para o infiltrado inflamatório, e uma alta produção de componentes microbicidas capazes de induzir lesão tecidual em magnitude suficiente para promover morte de células do tecido e necrose, o que justifica o dano tecidual, o aspecto ulcerado e o maior tamanho das lesões.

Além disso, o aumento de expressão gênica de arginase nos hamsters infectados por *L. amazonensis* em comparação aos hamsters infectados por *L. braziliensis*, parece ter relação direta com a maior carga parasitária naqueles.

Um mecanismo importante que pode contribuir para a morte ineficiente dos parasitos pelos macrófagos é a ativação alternativa dos mesmos (Gordon & Martinez 2010). Foi demonstrado que a diminuição na produção de óxido nítrico no modelo hamster para leishmaniose visceral, foi mediada pela produção de arginase por *L. donovani*, estimulada diretamente via STAT-6, sem a participação de citocinas do tipo 2. A arginase compete pelo mesmo substrato, a L-arginina, necessária para a

síntese de NO, ou seja, com a síntese de arginase, não ocorre a síntese de NO. Além do mais, durante a síntese de arginase, ocorre o aumento de poliaminas, que também favorecem o crescimento dos parasitos (Osorio *et al.* 2012).

Para as demais citocinas como IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4 existe um padrão de aumento de expressões gênicas nas infecções por *L. braziliensis*, sobretudo nas infecções de 100 dias de evolução, em relação aos animais infectados por *L. amazonensis*.

Dados da literatura demonstram que a *L. amazonensis* e a *L. braziliensis* possuem padrões de transmissão distintos e que o desenvolvimento e prognóstico da leishmaniose estão diretamente ligados à resposta imune do hospedeiro. Os pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentam uma resposta imune com perfil pró-inflamatório, enquanto que pacientes infectados por *L. amazonensis* apresentam um perfil de resposta imune mais regulada para uma condição de menor inflamação. Além disso, o antígeno de *L. braziliensis* se apresenta como um potente estimulador das respostas de células T, com alta expressão de IFN- $\gamma$  comparado ao antígeno de *L. amazonensis*. Por outro lado, o antígeno de *L. amazonensis* é tido como um supressor da resposta imune celular e isso pode ser vinculado ao direcionamento para o polo anérgico-multiparasitário do espectro clínico da leishmaniose tegumentar humana causada pela infecção por *L. amazonensis* (Silveira *et al.* 1998; Silveira *et al.* 2004).

As alterações imunopatogênicas do modelo hamster ocasionadas por *Leishmania*, foram baseadas em ferramentas moleculares para quantificação de expressão gênica induzida por espécies viscerotrópicas. Foi demonstrado o aumento na expressão de IL-2, IL-12, TNF, IL-10 e TGF- $\beta$ , indicando um perfil não polarizado de resposta imune (Melby *et al.* 2001). O mesmo grupo também contribuiu com o estudo da infecção por *L. (V.) panamensis* em lesões de hamsters, onde foi observado um perfil de resposta imune do tipo 1 (IL12p40, IFN- $\gamma$ ) e do tipo 2 (IL-10 e TGF- $\beta$ ) na fase crônica de infecção (Osorio *et al.* 2003). Também foi visto que a expressão gênica de citocinas e quimiocinas na infecção pela mesma espécie, aos sete dias após infecção também induziu um padrão misto de resposta, caracterizada pelo aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e IL12p40, assim como de IL-4, IL-13, IL-12 e IL-21, atribuindo ao perfil inicial de resposta a susceptibilidade à infecção observada no modelo (Espitia *et al.* 2010).

No presente trabalho, no modelo hamster infectado por *L. braziliensis* foi verificado que após 100 dias de infecção houve um aumento da expressão gênica

de todos os alvos testados - IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, TFG- $\beta$ , IL-4, iNOS e arginase - tanto na pele quanto no linfonodo, corroborando com resultados anteriores (Ribeiro-Romão *et al.* 2016).

De forma interessante, a expressão gênica de arginase e iNOS na infecção por *L. braziliensis*, foi contrária ao que ocorre no modelo hamster de LV (infecção por *L. donovani*). Enquanto que nos hamsters infectados por *L. braziliensis* foi observado um aumento da expressão de arginase de até 10 vezes em relação ao nível basal (calibrador), no modelo de LV foi demonstrado um aumento substancial, mais de mil vezes em relação aos controles não infectados. O presente estudo mostrou ainda que na infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster houve maior expressão de iNOS na pele (cerca de mil vezes em relação aos controles não infectados), diferente do observado em estudos de LV, nos quais a expressão nos baços de hamsters infectados com *L. donovani* foi baixa, semelhante ao controle não infectado (Melby *et al.* 2001, Perez 2006, Osorio *et al.* 2012). Enquanto isso, nos hamsters infectados por *L. amazonensis*, a expressão gênica de arginase foi 80 vezes maior em relação ao nível basal (calibrador). Já a expressão de iNOS nos hamsters infectados por *L. amazonensis* foi cerca de 100 vezes maior em relação aos controles não infectados.

Recentemente, o modelo hamster foi reconhecido como muito apropriado para estudos envolvendo infecção por *L. braziliensis* (Mears *et al.* 2015; Warner *et al.* 2016). No entanto, com a amplitude das abordagens imunológicas reduzida, muitos grupos de pesquisa que utilizam o hamster como modelo experimental de doenças humanas, ainda têm limitado sua abordagem apenas aos sinais clínicos e os aspectos patológicos.

O uso de anticorpos monoclonais que tenham reação cruzada contra marcadores imunes e citocinas de outras espécies tem dado aos pesquisadores que usam hamsters uma opção viável para certos ensaios. Já foi descrito que, por exemplo, os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 de camundongo e rato, respectivamente, foram capazes de gerar uma marcação cruzada no modelo hamster com síndrome pulmonar por hantavírus (Hammerbeck & Hooper 2011). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para o modelo hamster, impulsionariam muito as pesquisas que dependem dos ensaios imunológicos (Warner *et al.* 2016).

O aumento do interesse no uso do modelo hamster pelos pesquisadores, com conseqüente aumento da demanda por insumos imunológicos, pode fazer com

que empresas tenham interesse na produção de anticorpos monoclonais específicos para marcadores imunológicos e citocinas de hamsters.

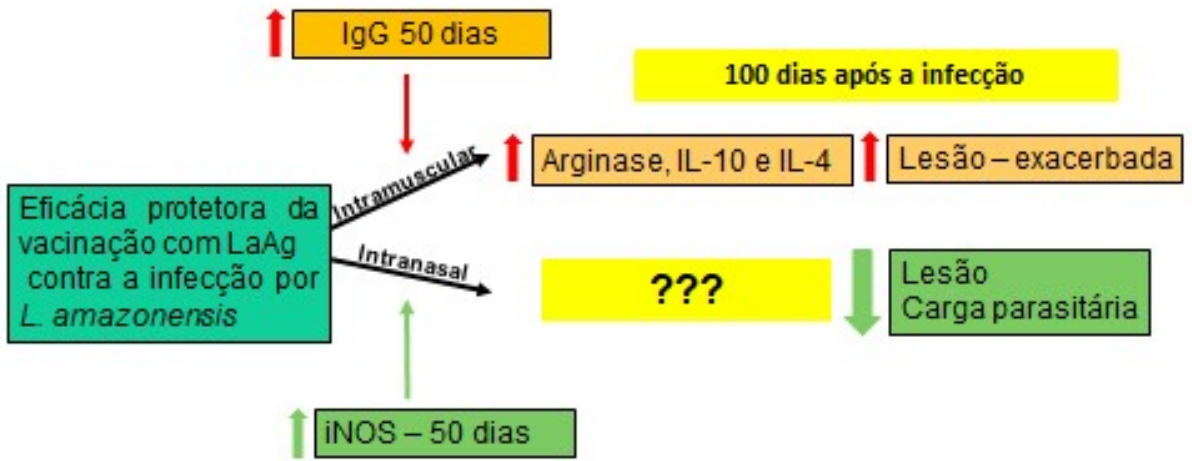
Em resumo, os estudos de imunoproteção demonstraram que a vacinação intranasal com LaAg induz proteção contra diferentes espécies de *Leishmania* relacionadas a LTA (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) no mesmo modelo experimental, o modelo hamster, indicando que a vacinação intranasal usando LaAg é altamente promissora no desenvolvimento de uma vacina humana eficaz contra as leishmanioses. E os estudos de imunopatogênese demonstraram que as diferenças observadas na comparação dos parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos em hamsters infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* reproduziram importantes aspectos observados na doença humana, indicando que o modelo hamster pode ser um modelo de estudo apropriado para estudos de imunopatogênese da LTA.

## 8. Conclusões

- A eficácia protetora da vacinação intranasal com LaAg contra a infecção por *L. amazonensis*, já demonstrada no modelo murino, foi estendida ao modelo hamster.
- A imunidade protetora contra a infecção por *L. amazonensis* induzida por LaAg é dependente da via de imunização, uma vez a imunização com LaAg pela via intramuscular, promoveu uma exacerbação da lesão.
- A análise de expressão gênica ao final de 100 dias após infecção por *L. amazonensis* sugeriu um padrão de resposta relacionado a uma maior gravidade da lesão observada no grupo LaAg IM.
- Não foi possível observar algum padrão de expressão gênica aos 100 dias associado à proteção vacinal observada no grupo LaAg IN.
- Os maiores títulos de IgG anti-*Leishmania* no grupo LaAg IM detectados nas fases intermediárias de evolução da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* pode ser um parâmetro preditor de um prognóstico desfavorável de evolução da doença.
- A maior expressão gênica de iNOS aos 50 dias nos animais do grupo LaAg IN comparados aos grupos controle e LaAg IM, pode ser um indicativo indireto de resposta imune associada a proteção na infecção por *L. amazonensis*.
- Com as análises da expressão gênica realizadas nas fases iniciais e intermediárias da infecção (5, 30 e 50 dias), não foi possível definir o mecanismo envolvido na imunoproteção induzida pelo LaAg pela via intranasal contra infecção por *L. braziliensis*.
- No final do acompanhamento da infecção (100 dias), as lesões dos hamsters infectados por *L. amazonensis* eram significativamente menores, ao contrário da carga parasitária que era muito maior que a observada nas lesões causadas por *L. braziliensis*.
- Quanto ao aspecto das lesões no tempo final do acompanhamento da lesão, o grupo infectado com *L. amazonensis* apresentou um predomínio de lesões nodulares, não ulceradas e o grupo infectado com *L. braziliensis* apresentou o predomínio de lesões ulceradas, com visível dano tecidual.
- A maior carga parasitária observada nos animais infectados por *L. amazonensis* em relação aos animais infectados por *L. braziliensis* parece ser dependente da relação entre iNOS e arginase.

- Nos animais infectados por *L. braziliensis* existe um perfil Th1 em evidência, o que pode estar relacionado ao controle da carga parasitária.

## Estudos de imunoproteção



# Estudos de imunopatogênese





## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhak S, Louzir H, Timm J, Blel L, Benlasfar Z, Lagranderie M, Gheorghiu M, Dellagi K, Gicquel B. 1995. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology*. 141 (7):1585-92.
- Afonso LC, Scott P. 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 61(7):2952-9.
- Aga E, Katschinski D, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. 2002. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 169(2):898-905.
- Aguilar Torrentera F, Lambot MA, Laman JD, Van Meurs H, beije R, Noël JC, Carlier Y 2002. Carga parasitária e histopatologia de lesões cutâneas, linfonodo, baço e fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg*. 66 (3): 273-279.
- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J. Immunol* 161:6794-6801.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WLC 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671.
- Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, et al. 2002. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97:1041–8.
- Bakke H, Lie K, Haugen IL, Korsvold GE, Høiby EA, et al. 2001. Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. *Infect. Immun*. 69: 5010–5015
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, MC Udey, Wynn TA, Sacks DL. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of Anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.*, v. 194 (10), p.1497–1506.

- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420 (6915): 502-507.
- Berhe N, Hailu A, Gemetchu T. 1995. Human immunodeficiency virus and recurrence of cutaneous leishmaniasis long after healed localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania aethiopica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 400-401,
- Borja-Cabrera GP, Santos FN, Santos FB, Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, Castro T, Nogueira FS, Moreira MA, Luvizotto MC, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB 2010. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 28:597-603.
- Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D, Mitolo V 2001. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 43:Suppl 1:1-6
- Castellucci LC, Almeida LF, Jamieson SE, Fakiola M, Carvalho EM, Blackwell JM 2014. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:279-288.
- Chakravarty, J. *et al.* (2011) A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 29, 3531–3537.
- Chen K, Cerutti A 2010. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity* 33:479-491.
- Connell ND<sup>1</sup>, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG.1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*24:11473-7.
- Costa Souza BL. Vacina intranasal LACK DNA contra a leishmaniose cutânea: Estudos de duração da eficácia, associação vacinal e aprimoramento por micro/nanoestruturação em polímero mucoadesivo. Tese: Biofísica (Imunobiologia). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ/RJ. 2011.

- Coutinho S, Pirmez C, Mendonça S, Conceição-Silva F, Dórea R 1987. Pathogenesis in immunopathology of leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 82: 214-228.
- Cunningham A. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. Exp Mol Pathol. 72:132-41.
- Da-Cruz AM, Pirmez C 2012. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR (eds). Dinâmica das Doenças Infecciosas. 2a. Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro
- Davoudi N, Khamesipour A, Mahboudi F, McMaster WR 2014. A dual drug sensitive *L. major* induces protection without lesion in C57BL/6 mice. PLoS Negl Trop Dis 8:e2785.
- Da Silva-Couto L, Ribeiro Romão RP, Saavedra AF, Souza Costa Costa BL, Moreira OC, Gomes-Silva A, Rossi-Bergmann B, Da-Cruz AM, Pinto EF 2015. Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. PLoS Negl Trop Dis. 9 (1): e3439-446
- DeKrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. Infect Immun 66:827-829.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça SC 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. Vaccine 17:1179-1185.
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infect Immun 73:5827-5834.
- De Oliveira Gomes DC, DA Silva Costa Souza BL, DE Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2011. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. Parasitology 138:1892-1897.
- De Oliveira Gomes DC, Schwedersky RP, Barbosa De-Melo LD, Da Silva Costa Souza BL, De Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2012. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. Parasitology 139:1562-1569.

- Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Microbiol Infect Dis.*: 27:305-318.
- Dumonteil E.; Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario GM 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. 21: 2170-2177.
- Ebihara H, Zivcec M, Gardner D, Falzarano D, LaCasse R, Rosenke R, Long D, Haddock E, Fischer E, Kawaoka Y, Feldmann H. 2013. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic fever. *J. Infect Dis.* (2):306-318.
- Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, Travi BL, Melby PC 2010. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol* 22: 11-31.
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, de Freitas E, Melo MN, et al. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*; 26 (46):5888–95.
- Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR 2014. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2914.
- Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcão A 2014. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: Small-molecules and biomacromolecules. *Eur J Pharm Biopharm.* 87:409-432
- Gomes DC, Pinto EF, de Melo LD, Lima WP, Larraga V, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2007. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25:2168-2172.
- Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Clin Exp Immunol* 149:440-444.
- Gomes-Silva A. Ativação de linfócitos remanescentes na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: reflexões sobre prognóstico, critérios de cura e imunoprofilaxia na leishmaniose tegumentar Americana. Tese: Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ 2011.

- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão R.P., Plácido-Pereira R.M., Da-Cruz A.M. 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140:771–779.
- Goto H, Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:419-433.
- Goulding D, Thompson H, Emerson J, Fairweather NF, Dougan G, Douce GR. 2009. Distinctive profiles of infection and pathology in hamsters infected with *Clostridium difficile* strains 630 and B1. *Infect Immun.*77(12): 5478-85.
- Grimaldi G, Teva A, Porrozzi R, Pinto MA, Marchevsky RS, Rocha MG, Dutra MS, Bruña-Romero O, Fernandes AP, Gazzinelli RT 2014. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 8:2853.
- Gurunathan S; Sacks DL; Brown DR; Reiner SL; Charest H; Glaichenhaus N; Seder RA. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine* 186:1137-1147.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Reviews Immunology* 18:927-974.
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderraa LB, Santrich CV, Saravia NG 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 45:281-289.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol* 89:55-73.
- Hammerbeck CD, Hooper JW. 2011. T cells are not required for pathogenesis in the Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *J Virol.*, 86 (7):4043
- Hoft DF, Eickhoff CS 2002. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 70:6715-6725.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *The Indian journal of medical research*, 123, 423-438.

- Kedzierski L, Zhu Y, Handman E 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitol* 133: 87-112.
- Kedzierski L 2010. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2:177-185.
- Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191:1063-1068.
- Kumari S, Samant M, Khare P, Misra P, Dutta S, Kolli BK. 2009. Photodynamic vaccination of hamsters with inducible suicidal mutants of *Leishmania amazonensis* elicits immunity against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*; 39(1):178–91.
- Lainson R. 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 77 (5):569-96.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W 2003. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11:210-214.
- Launois P, Maillard I, Pingel S, Swirhart KG, Xenarius I, Achaorbea H, Diggelmann H, Locksley RM, MacDonald HR, Louis JA. 1997. IL4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4 (+) T cells instructs the development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, 6: 541-549.
- Lynn MA, McMaster WR. 2008. *Leishmania*: conserved evolution - diverse diseases. *Trends in Parasitology* 24: 103-105.
- Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56:1-11.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Makala LHC, Nishikawa Y, Suzuki N, Nagasawa H 2004. Immunology - Antigen-presenting cells in the gut. *J. Biomed. Sci.* 11:130-141
- Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P. 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73(4): 385-7
- Marques-da-Silva EA, Coelho EA; Gomes DC; Vilela MC; Masioli CZ; Tavares CA; Fernandes AP; Afonso LC; Rezende AS. 2005. Intramuscular immunization with p36 (LACK)DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not

- protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research*;98(1):67–74.
- Marzochi KB, Marzochi MA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:205-212.
- Maspi N, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Dayer MS 2017. Immunogenicity and efficacy of a bivalent DNA vaccine containing LelF and TSA genes against murine cutaneous leishmaniasis. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125, 249-258.
- McAtee CP, Seid CA, Hammond M, Hudspeth E, Keegan BP, Liu Z, Wei J, Zhan B, Arjona-Sabido R, Cruz-Chan V, Dumonteil E, Hotez PJ, Bottazzi ME 2017. Expression, purification, immunogenicity and protective efficacy of a recombinant nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*, a vaccine candidate for preventing cutaneous leishmaniasis. *Protein expression and purification*, 130, 129- 136.
- McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez J R, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez J F, Lohman K L, Ruddle N H 1993. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun*. 61(8): 3351–3359.
- Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. 2015. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 9 (9):e0003889.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.
- Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J 2001. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun*.69(8): 4719-4725.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201:747754.

- Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde; Departamento De Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde. 2017; 2: 22.
- Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde. 2013; 1: 19.
- Michel T, Feron O. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* (9): 2146-2152.
- Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268:563-566.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, p. 1561-1577.
- Nagill R, Kaur S 2011. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *Int Immunopharmacol* 11:1464-1488.
- Neutra MR, Kozlowski PA. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6:148-158.
- Oliveira CI TM, Gomes R, Barral A., Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 1:81-86.
- Osorio EY, Gonzalez SJ, Gama VL, Travi BL. 1998. Reinfection in American cutaneous leishmaniasis: evaluation of clinical outcomes in the hamster model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(3):353-356.
- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC 2012. Progressive Visceral Leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host Arginase 1 expression. *PloS Pathog* 8: 1-17.
- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol* 25:139-148.
- Perez LE, Chandrasekar B, Saldarriaga OA, Zhao W, Arteaga LT, Travi BL, Melby PC 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176:5519-5528.



- Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B 2005. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 7:1317-1323.
- Pinto EF, De Mello Cortezia M, Rossi-Bergmann B 2003. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 21:3534-3541.
- Pinto, EF; Matta, NE; Cruz, AM 2011. Vacinas: progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis. *Acta Biologica Colombiana*. 16:197-212.
- Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B 2004. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infect Immun* 72:4521-4527.
- Pleass RJ, Woof JM 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol* 17:545-551.
- Pratti JE, Ramos TD, Pereira JC, da Fonseca-Martins AM, Maciel Oliveira D, Oliveira Silva G, Mello MF, Chaves SP, Gomes DC, Díaz BL, Rossi-B Bergmann, de Matos Guedes HL 2016. Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania amazonensis* infection in partially resistant C57BL/6 mice. *Parasit Vectors* 9: 534-545.
- Ramos I, Alonso A, Marcen J.M, Peris A, Castillo J.A, Colmenares M, Larraga V 2008. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26(3) 333-344.
- Rey L 2008. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 883 pp.
- Ribeiro-Romão R.P. Influência do inóculo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Experimental no modelo Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). Tese: Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ 2013.
- Ribeiro-Romão, RP.; Moreira, OC; Osorio, EY.; Cysne-Finkelstein, L.; Gomes-Silva, A. 2014 Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by

- inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. Infect. Immun. v.82(12) p.5203- 5213.
- Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF and Moreira OC 2016. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Parasites & Vectors 9:361- 373.
- Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G 2009. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? Trends Parasitol 25:505-510.
- Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. Infect Immun 75:3823-3832.
- Russo DM; Burns JM; Carvalho EM; Armitage RJ; Grabstein KH; Button LL; McMaster WR; Reed SG. 1991. Human T-cell responses to gp63, a surface-antigen of leishmania. J Immunol 147:3575-3580.
- Quinnell RJ, Courtenay O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology 136: 1915-1934
- Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, 2007 Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. Clin.Vac Immunol.14 : 1173-1181.
- Safronetz D, Hegde NR, Ebihara H, Denton M, Kobinger GP, St Jeor S, Feldmann H, Johnson DC. 2009. Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with andes virus. J Virol. Jul;83(14):7285-7295.
- Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H, Hooper JW. 2012. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. Antiviral Res. 95(3):282-292.
- Saravia NG, Escorcía B, Osorio Y, Valderrama L, Brooks D, Arteaga L, Coombs G, Mottram J, Travi BL 2006. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. Vaccine 24:4247-4259
- Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 21:483-488.

- Silva EM, Bertho AL, Mendonça SC. 1994. Effect of invivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. Acta Trop.56:111-120.
- Silva KLO, Santos DP, Coelho NMD, Silva DC, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Júnior E 2013. Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. Archives of Health Investigation, 2(4), 18-28.
- Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, Soong L, Kima P, McMahon-Pratt D, Black GF, Shaw MA. 1998. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. Parasite Immunology 20: 19-26
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99: 239-251.
- Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. 2008. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102: 1075-1080.
- Solbach W, Laskay T. 2000. The host response to *Leishmania* infection. Adv Immunol. 74:275-317.
- Soong L, Henard CA, Melby PC. 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. Semin Immunopathol 34:735-751.
- Stockdale L, Newton R. 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. PLoS Negl Trop Dis 7:e2278.
- Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, Wilson ME. 2000. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. Exp Parasitol.(94):33-41.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting Edge. 2004. Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol. 173 (11):6521-25.
- Vélez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, Zicker F, Modabber F. 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 99(8):593-598.

- Veras P, Brodskyn C, Balestieri F, Freitas L, Ramos A, Queiroz A, et al. 1999. A dhfr-ts *Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94:491–6
- Winkler, B.; Baier, K.; Wagner, S.; Repa, A.; Eichler, HG.; Scheiner, O.; Kraft, D. & Wiedermann, U. 2002. Mucosal tolerance as therapy of type I allergy: intranasal application of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice. Clin. Exp. Allergy; 32: 30-36.
- Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY. 1995. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). Immunology; (85)1-7.
- Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY. 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. J Immunol. (7):2281-5.
- Zivcec M, Safronetz D, Haddock E, Feldmann H, Ebihara H. 2011. Validation of Assays to Monitor Immune Responses in the Syrian Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). J Immunol Methods. 368(1-2): 24–35.

