



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL PROTETOR DE HISTONAS NUCLEOSSOMAS DE
Leishmania COMO ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EXPERIMENTAL CAUSADA POR *L. braziliensis***

MARIANA IVO KHOURI

Salvador – Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL PROTETOR DE HISTONAS NUCLEOSSOMAS DE
Leishmania COMO ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A LEISHMANIOSE
CUTÂNEA EXPERIMENTAL CAUSADA POR *L. braziliensis***

MARIANA IVO KHOURI

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paiva Farias

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga

Dissertação de mestrado apresentado ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa para obtenção do grau em
mestre.

Salvador – Bahia

2020

AVALIAÇÃO DO PAPEL PROTETOR DE HISTONAS NUCLEOSSOMAS DE
Leishmania COMO ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A LEISHMANIOSE CUTÂNEA
EXPERIMENTAL CAUSADA POR *L. braziliensis*.

MARIANA IVO KHOURI

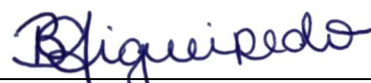
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 03 de setembro de 2020.

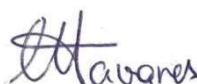
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Carina Silva Pinheiro
Professora
UFBA



Dra. Barbara de Castro Pimentel Figueiredo
Professora
UFBA



Dra. Natalia Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Instituto Gonçalo Moniz – IGM

AGRADECIMENTOS

Após três anos de mestrado, tenho muito a agradecer por ter chegado até aqui.

Agradeço inicialmente a Deus, pelo dom da vida e pela minha saúde. Minha fé me permitiu continuar minha jornada nos períodos de dificuldade.

Ao meu orientador Leonardo, por todos os ensinamentos, e paciência. Com certeza vou levar comigo conhecimentos que vão muito além do mundo da ciência.

Ao Dr Manuel Soto, pela produção das proteínas recombinantes.

A Dra Mayra, pelo apoio nos ensaios in vitro.

Ao amigo Vinicius Pires, por todo o auxílio nos ensaios de formulação.

A Jessica Lobo, pela parceria, e conselhos, não só no laboratório, mas na vida.

A Flávio Henrique, pela amizade e por ceder as leishmanias nocaute.

Ao CIENAM, em especial Valdinei, pelas análises feitas.

A Dra Sayonara, pelo apoio nos ensaios de citometria.

A todos os professores da pós graduação por todo o conhecimento passado durante as aulas ministradas.

A biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna.

A plataforma de microscopia, em especial a Cláudio pelas ajudas prestadas.

A toda a equipe LIB/LEITV pela parceria e amizade durante esses anos. Os nossos almoços e lanches ficaram sempre guardados na memória.

Ao meu grupo LPF (Jessica, Fernanda, Flávio, Luiz e Almiro), vocês fazem todos os momentos no laboratório mais leves e especiais.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha mãe, Ana Paula. Minha força e inspiração de vida. Minha parceira, sem você, nada disso seria possível. Obrigada por estar sempre ao meu lado e ser minha base.

Agradeço também a minha irmã, Ana Carolina, que mesmo a distância, me incentiva e me inspira todos os dias.

Ao meu namorado Gabriel Victor, por toda a paciência, amor e parceria durante essa jornada. Obrigada por ser o melhor companheiro e amigo que eu poderia ter.

Agradeço ao meu pai, e todos os meus familiares que estiveram presentes e me apoiando durante essa jornada.

Agradeço também a todos os amigos, que sempre estiveram presentes, em especial a Mari, Ádria, Bruna, Taiane e Correia.

Às agências financiadoras, CNPq e IGM.

Ao IGM por garantir toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho e ser minha segunda casa nos últimos 5 anos.

Foram três anos de muito trabalho e estudo, mas hoje só tenho a agradecer. Obrigada por cada pessoa que passou por minha vida e esteve comigo neste período. Esse trabalho não é só meu, mas de todos vocês!

“Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina.”
(Confúcio)

KHOURI, Mariana Ivo. Avaliação do papel protetor de histonas nucleossomais de *Leishmania* como estratégia vacinal contra a leishmaniose cutânea experimental causada por *L. braziliensis*. 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRUDUÇÃO: A vacinação é uma das intervenções médicas mais importantes já implementadas. Apesar de todos os avanços, ainda existem muitas doenças sem vacinas disponíveis. Entre estas doenças, pode-se destacar a leishmaniose. Esta é uma doença parasitária que apresenta grande impacto na saúde pública. Existe um consenso que a indução de uma forte resposta imune celular seja protetora para leishmaniose. Dentre as novas plataformas para apresentar antígenos e induzir esta resposta podemos destacar novas formas de *delivery* e os adjuvantes. Neste trabalho, foram abordadas três estratégias visando gerar conhecimentos sobre o desenvolvimento de uma vacina contra este parasito. Primeiramente, foi avaliado o efeito adjuvante de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) catiônicas e aniônicas sobre histonas nucleossomais de *L. infantum* em células dendríticas (DC) murinas. Posteriormente, foi avaliado o efeito protetor destas histonas nucleossomais como antígenos vacinais em associação com CpG ODN, bem como de parasitos nocautes, ambos utilizando o modelo murino cutâneo de *L. braziliensis*. **OBJETIVO:** Avaliar o papel protetor de histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) de *Leishmania* como estratégia vacinal contra a leishmaniose cutânea experimental causada por *L. braziliensis*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** As NLS catiônicas e aniônicas foram preparadas pelo método de dupla emulsão, utilizando Precirol ATO 5 como um lipídio, e quitosana a fase aquosa externa para obter NLS catiônicas. As partículas foram analisadas por tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta por espalhamento dinâmico de luz. Em seguida, a captação de NLS por DC e ativação delas foi avaliada por microscopia confocal e citometria de fluxo, respectivamente. Para os ensaios de imunização e desafio foi utilizado o modelo de infecção de orelha em BALB/C. Foram realizadas três imunizações com histonas nucleossomais acompanhadas de CpG, ou uma imunização com *L. infantum* nocaute para o gene LPG2 (*Li Δlpg2*). Após o desafio com *L. braziliensis* o curso da doença foi avaliado medindo o tamanho da lesão, e decorridas 10 semanas do desafio, foi avaliada a carga parasitária, a resposta imune celular e humoral. **RESULTADOS:** Foi possível padronizar formulações de nanopartículas negativas e positivas. Estas apresentaram tamanhos médios de 260 e 340 nm, respectivamente, cargas de -31 e +56 mV e índices de polidispersão de 0,2 e 0,4. Em seguida, a avaliação da captação por DC demonstrou uma baixa taxa de internalização. Além disto, não foi possível notar diferenças nos marcadores de ativação celular após exposição das DC às NLS. Ensaios de imunização e desafio revelaram uma redução significativa do tamanho de lesão apenas no grupo imunizado com o parasito nocaute *Li Δlpg2*. Também houve uma redução da carga parasitária no linfonodo em todos os grupos quando comparados ao grupo Salina. A análise da resposta humoral revelou razões equilibradas IgG2a/IgG1 para os grupos salina e histona + CpG contra antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA), e uma resposta de perfil mais Th1 para o grupo *Li Δlpg2*. Não houve diferença significativa na produção de citocinas por esplenócitos entre os grupos avaliados. **CONCLUSÕES:** Foi possível padronizar a produção de NLS positivas e negativas, porém essas não demonstraram um efeito adjuvante. A imunização com *Li Δlpg2* levou à proteção parcial contra o desafio por *L. braziliensis* e esta proteção pode estar associada a uma resposta de perfil Th1 contra SLA.

Palavras-Chave: Adjuvantes, Nanopartículas lipídicas sólidas, Histonas nucleossomais, *Leishmania*, Vacinas.

KHOURI, Mariana Ivo. Evaluation of *Leishmania* nucleosomal histones protection against experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Vaccination is one of the most important medical interventions developed so far. Despite all the advances, there are many diseases without available vaccines. Leishmaniasis is one of them, a parasitic disease with considerable impact on public health. There is a consensus that protective immunity can be achieved through the induction of a strong cellular immune response against this parasite. Among the new vaccine available platforms for antigen presentation and the induction of such response, we can highlight new delivery systems and adjuvants. In this work, we have approached three different antigen presentation strategies to generate knowledge about the development of a vaccine against this parasite. First, we evaluated the adjuvant effect of cationic and anionic solid lipid nanoparticles (SLN) on *L. infantum* nucleosomal histones in murine dendritic cells (DC). Next, the protective effect of the nucleosomal histones in association with CpG ODN adjuvant or the use of knockout parasites *Li Δlpg2* were evaluated, both exploring the cutaneous model of *L. braziliensis*. **OBJECTIVE:** Assess the protective role of nucleosomal histones (H2A, H2B, H3 and H4) of *L. infantum* as a vaccine strategy against experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. **METHODS:** Cationic and anionic SLN were prepared by the double emulsion method, using Precirol ATO 5 as a lipid, and chitosan as the external aqueous phase to obtain cationic NLS. The particles were analyzed by size, polydispersity index (PDI) and zeta potential by dynamic light scattering. Then, the uptake of SLN by DC and their activation were evaluated by confocal microscopy and flow cytometry, respectively. For immunization and challenge assays we have used the BALB/C ear infection model. Three immunization doses were performed with nucleosomal histones and CpG ODN, or one immunization dose with *L. infantum* knockout *Li Δlpg2*. After *L. braziliensis* challenge the course of the disease was monitored by lesion size. Ten weeks after the challenge, parasitic load, cellular and humoral immune response were evaluated. **RESULTS:** Negative and positive SLN were successfully formulated. These presented average sizes of 260 and 340 nm; charge of -31 and +56 mV and polydispersity indexes of 0.2 and 0.4, respectively. The uptake assays revealed low internalization loads of SLN by DC. Moreover, DC cells did not reveal an activation profile after SLN exposure. Immunization and challenge trials revealed a significant reduction in lesion size only in the group immunized with the knockout parasite *Li Δlpg2*. There was also a reduction in the parasitic load on the lymph nodes of all analysed groups in comparison to control group. The analysis of the humoral response revealed a balanced IgG2a / IgG1 ratio for control and histone + CpG groups against soluble *Leishmania* antigens (SLA), and a more Th1 profile response for the *Li Δlpg2* and CpG control groups. No significant difference in the production of cytokines by splenocytes from different groups was observed. **CONCLUSIONS:** Positive and negative SLN were formulated, however, this formulation did not induce an adjuvant effect. The immunization with *Li Δlpg2* partially protects mice against *L. braziliensis* and this could be related to a more Th1 prone immune response induced against SLA.

Key-words: Adjuvants, Solid lipid nanoparticles, Nucleosomal Hhstones, *Leishmania*, Vaccines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Etapas de produção do Precirol ATO 5 (Glyceryl palmitostearate)	27
Figura 2 Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	31
Figura 3 Representação do nucleossomo	36
Figura 4 Similaridade e identidade de sequência de histonas entre as espécies de <i>Leishmania</i>	37
Figura 5 Esquema de formulação de partículas sólidas lipídicas	45
Figura 6 Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartícula lipídica sólida	52
Figura 7 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão representativas da formulação	53
Figura 8 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão	55
Figura 9 Microscopia de fluorescência invertida de macrófagos murinos tratados com nanopartículas lipídicas sólidas por 24 horas	57
Figura 10 Microscopia confocal de células dendríticas murinas tratadas com nanopartículas lipídicas sólidas contendo BSA-FITC por 24 horas.	58
Figura 11 Citometria de fluxo de células dendríticas murinas após exposição a nanopartículas	60
Figura 12 Cronograma de imunizações e infecção representada por semanas.	68
Figura 13 Eletroforese em gel de poliacrilamida em gel a 17%.....	72
Figura 14 Progressão da doença através das medidas do tamanho de lesão da orelha de camundongos.	73
Figura 15 Carga parasitária nos linfonodos dos grupos de animais imunizados.....	74
Figura 16 Determinação da resposta humoral após imunização e desafio por ELISA	76
Figura 17 Resposta imune celular de esplenócitos reestimulados.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Algumas das principais estratégias utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose.	34
Tabela 2 Sumário de estudos realizados com histonas nucleossomais de <i>Leishmania</i>	39
Tabela 3 Pré-formulação partículas nanométricas carregadas positivamente e micrométricas carregadas negativamente.	44
Tabela 4 Resultados esperados para formulações de partículas sólidas lipídicas e poliméricas.	46
Tabela 5 Resumo dos resultados da pré-formulação das partículas nanométricas de carga positiva.	52
Tabela 6 Resumo dos resultados da pré-formulação das partículas micrométricas de carga negativa.	54
Tabela 7 Estabilidade de nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas e aniônicas durante 60 dias.	56
Tabela 8 Características das histonas nucleossomais de <i>Leishmania</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GALCER	α -Galactosylceramide
A1	fase aquosa interna
A2	fase aquosa externa
APC	antigen present cell
AS	Adjuvant System
AUC	Area under the curve
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BSA	bovine serum albumin
CBA	Cytometric Bead Array
CCL	Chemokine ligand
CPA	Cysteine peptidase A
CpG ODN	Cytosine phosphodiester guanine oligodeoxynucleotides
CRISPR/CAS9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSF	Colony-stimulating factor
DALY	Disability-Adjusted Life Years
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritic cell
DLS	Dynamic light scattering
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO	Densidade óptica
DOTAP	Dioleoyl-3-trimethylammonium propane
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FML	Fucose mannose ligand
FO	Fase orgânica
GLA-SE	Glucopyranosyl Lipid Adjuvant – Stable Emulsion
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP63	Glycoprotein 63
GST	Glutathione S-transferase
HIV	Human immunodeficiency virus
HPV	Human papillomavirus
HIS	H2A, H2B, H3, H4
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gamma
ISCOM	Immune stimulating complexes
kDa	Kilodaltons
KDO	3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid
KMP11	Kinetoplastid membrane protein 11
LACK	<i>Leishmania</i> homologue of activated C kinase
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate

<i>Li</i> Δpg	<i>L. infantum</i> nocaute para LPG2
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC	Major histocompatibility complex
MPLA	Monophosphoryl Lipid A
NK	Natural killer
NLR	NOD like receptor
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
nm	Nanometro
NO	Nitric oxide
NP	Nanopartícula
OMV	Outer membrane vesicle
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate-buffered saline
PdI	Polydispersity index
PFA	Paraformaldeído
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PolyI:C	Polyinosinic polycytidylic acid
PMBC	Peripheral blood mononuclear cell
PPG	Proteophosphoglycan
PVA	Polyvinyl acetate
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SLA	Second-generation lipid adjuvant
SLA	Soluble <i>Leishmania</i> antigen
T.A.	Temperatura ambiente
Th	T helper
TLR	Toll like receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor necrosis factor
TRITC	Tetramethylrhodamine
µm	Micrometro
VLP	Virus like particles
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	A IMPORTÂNCIA E OS DESAFIOS DA VACINAÇÃO	20
2.1.1	Doenças sem vacinas disponíveis.....	20
2.1.2	Resposta imune nas vacinas.....	21
2.2	ADJUVANTES	22
2.2.1	Importância dos adjuvantes para desenvolvimento de vacinas	22
2.2.2	Mecanismos de ação dos adjuvantes	22
2.2.3	Tipos de adjuvantes	24
2.2.3.1	<i>Sistemas de delivery nanoparticulados</i>	24
2.2.3.1.1	Nanopartículas lipídicas sólidas	26
2.2.3.2	<i>Adjuvantes imunomodulatórios</i>	28
2.2.3.2.1	CpG ODN	29
2.3	AS LEISHMANIOSES	30
2.3.1	Impacto da Leishmaniose	30
2.3.2	Ciclo de vida do parasito	31
2.3.3	Resposta imune contra a leishmaniose tegumentar	31
2.3.4	Vacinação contra leishmaniose.....	32
2.3.4.1	<i>Histonas nucleossomais</i>	35
3	OBJETIVO GERAL	41
	CAPÍTULO 1 – Desenvolvimento de um sistema nanoparticulado lipídico e avaliação do efeito adjuvante sobre histonas nucleossomais de <i>Leishmania</i> em células dendríticas murinas	42
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5	MATERIAIS E MÉTODOS	44

5.1	PRÉ-FORMULAÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	44
5.1.1	Preparação de partículas lipídicas sólidas.....	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	46
5.2.1	Tamanho, Índice de polidispersão (PDI), potencial zeta.....	46
5.2.2	Análise morfológica.....	46
5.2.2.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	46
5.2.3	Estabilidade de 60 dias	47
5.3	CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	47
5.4	CULTURA CELULAR.....	48
5.4.1	Células dendríticas.....	48
5.4.2	Macrófagos	48
5.5	ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS	49
5.6	ENSAIO DE ATIVAÇÃO	49
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
6	RESULTADOS	51
6.1	ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO	51
6.1.1	Partículas nanométricas de carga positiva.....	51
6.1.2	Partículas micrométricas de carga negativa.....	53
6.2	ESTABILIDADE ATÉ 60 DIAS	56
6.3	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	57
6.4	AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DAS NLS POR MACRÓFAGOS E DC	57
6.5	ENSAIO DE ATIVAÇÃO	59
7	DISCUSSÃO	61
 CAPÍTULO 2 – Avaliação do efeito protetor das histonas nucleossomais como antígenos vacinais em associação com CpG ODN utilizando o modelo cutâneo de <i>L. braziliensis</i>.....		
		64

8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
9	MATERIAIS E MÉTODOS	66
9.1	CARACTERIZAÇÃO DAS HISTONAS NUCLEOSSOMASIS	66
9.1.1	Produção das proteínas recombinantes e antígenos solúveis de <i>Leishmania</i> (SLA)	66
9.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida	66
9.2	CULTIVO DE PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania</i>	67
9.2.1	Cultivo de promastigota de <i>L. braziliensis</i> para desafio.....	67
9.2.2	Cultivo de promastigota de nocautes de <i>L. infantum</i> Δ lpg2 para imunização..	67
9.3	ENSAIO IN VIVO	67
9.4	ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE	68
9.5	ENSAIO DE RESPOSTA IMUNE	69
9.5.1	Produção de anticorpos após imunização	69
9.5.2	Resposta imune de esplenócitos reestimulados	70
9.6	PROPOSTA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
10.	RESULTADOS	71
10.1	CARACTERIZAÇÃO DAS HISTONAS NUCLEOSSOMASIS	71
10.1.1	Características físico-químicas das histonas nucleossomais	71
10.1.2	Padrão de migração das histonas em eletroforese em gel de poliacrilamida.....	72
10.2	ENSAIO IN VIVO	72
10.3	DILUIÇÃO LIMITANTE	73
10.4	RESPOSTA HUMORAL	74
10.5	RESPOSTA CELULAR.....	77
11	DISCUSSÃO	79
12	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A vacinação é uma das intervenções médicas mais importante já implementada, prevenindo a morte de cerca de 2.5 milhões de pessoas por ano no mundo, o que equivale a evitar 7 mil mortes todos os dias (WHO, 2017). Apesar do sucesso da vacinação, ainda existem muitas doenças de alto impacto na saúde pública sem vacinas disponíveis, como por exemplo, o HIV, tuberculose, esquistossomose, malária e leishmaniose. A falta de uma vacina contra essas doenças tem motivações diversas, mas pode-se destacar a alta complexidade e variabilidade antigênica de algum desses microrganismos, a falta do completo entendimento dos mecanismos de proteção e o fato da maioria delas atingir populações marginalizadas o que inibe o interesse comercial de grandes empresas farmacêuticas (SACKS et al., 2014).

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, é a segunda doença parasitária que mais leva a óbito, e a terceira doença em anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY) (DEN BOER et al., 2011). A leishmaniose pode ser classificada como tegumentar (LT) ou visceral (LV) (PEARSON e SOUSA, 1996). Foi estabelecido que uma resposta protetora para leishmaniose deve induzir uma forte resposta imune celular caracterizada pela presença de linfócitos T CD4, produtores de IFN- γ , e baixa produção de IL-4 e IL-10 (CARVALHO et al., 1994; BELKAID et al., 2002). No caso da LT, essa resposta celular deve ser capaz de diminuir o desenvolvimento da lesão e a replicação parasitária. O fato de seres humanos desenvolverem uma imunidade protetora e de longa duração após a cura de lesões cutâneas por leishmaniose reforça o racional de desenvolvimento de uma vacina (PETERS et al., 2014).

Entre os antígenos estudados para o desenvolvimento de uma vacina contra *Leishmania*, as histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) revelaram um papel protetor em modelo experimental murino contra a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (CARRION et al., 2007; CARRION et al., 2008a; AGALLOU et al., 2012). Além disso, já foi visto que estas proteínas são identificadas pelo sistema imune de pacientes com leishmaniose. Foram detectados anticorpos contra as histonas H2A e H2B em pacientes com leishmaniose visceral (MAALEJ et al., 2003; PASSOS et al., 2005), e contra as histonas H1 e H2B em pacientes com leishmaniose cutânea (CARMELO et al., 2006). Além da resposta humoral, as histonas nucleossomais de *Leishmania* também estão envolvidas na resposta imune celular. Foi demonstrado que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com

leishmaniose cutânea quando estimuladas com H2B ou H3 são capazes de proliferar e secretar IFN- γ (DE CARVALHO et al., 2003).

A maioria dos trabalhos feitos até o momento com estes antígenos utilizaram vacinas de DNA, que resultaram em respostas de perfil Th1 com proteção parcial (IBORRA et al., 2004; CARRION et al., 2008b; CHENIK et al., 2006; CARRION, 2011). Apenas três trabalhos avaliaram as histonas nucleossomais sob a forma de proteínas recombinantes para LT. Masina et al., 2003 avaliaram a histona H1 formulada com o adjuvante Montanide, e observaram redução do tamanho da lesão. Entretanto, este adjuvante apresenta limitações como não ser biodegradável, não ser muito estável a longo prazo, e em alguns casos induzir efeitos colaterais adversos (VAN DOORN et al., 2016). O segundo trabalho avaliou a histona H2B associado a CpG como sistema de vacinação, o que resultou na proteção de camundongos BALB/c contra infecção com *L. major* (CHENIK et al., 2006). O terceiro trabalho avaliou a imunização combinada entre vacina de DNA e proteína recombinante (H2A, H2B, H3 e H4) de *L. infantum*, o que levou a uma maior produção de IFN- γ em camundongos desafiados por *L. braziliensis* (CARNEIRO et al., 2012). Entretanto, para leishmaniose tegumentar, não há nenhum trabalho avaliando exclusivamente as quatro histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) sob a forma de proteínas recombinantes.

Antígenos formulados com CpG ODN (oligodeoxynucleotides) tem a capacidade de levar à ativação de linfócitos B e células dendríticas levando à secreção de IFN- γ (BONAM et al., 2017). O potencial adjuvante do CpG já é bem elucidado na literatura. Antígenos de HBV associados à CpG levaram ao aumento de 1000 vezes na produção de anticorpos quando comparados aos antígenos livres (DAVIS et al., 1998). Além disto, já foi demonstrado que o CpG leva à produção de citocinas de perfil Th1 (STERN et al., 2002).

Além da formulação com CpG, antígenos podem ser encapsulados em nanopartículas (NPs). Desta forma, os antígenos são protegidos contra a degradação e induzem respostas imunológicas mais duradouras e localizadas (GREGORY et al., 2013). A incorporação de antígenos em NPs permite que o imunógeno seja apresentado às células do sistema imune de maneira a mimetizar a infecção por patógenos, induzindo, portanto, resposta imune similar, porém com menos efeitos adversos. Além disso, o encapsulamento leva a redução da quantidade de antígeno administrado para a indução de uma resposta imune adequada (SINGH, et al., 2000).

A apresentação de antígenos às células dendríticas (DCs) é essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora. Antígenos formulados em NPs são captados com maior eficiência pelas DCs quando comparados à captação de antígenos solúveis isolados (UTO et al., 2011). NPs carreando ovalbumina foram capazes de aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de citocinas quando comparado à proteína livre ou a proteína associada à Alum (UTO et al., 2009). As características físico-químicas das NPs podem influenciar na resposta imune, já foi descrito que NPs catiônicas e com tamanho entre 300 - 1000 nm melhoram a apresentação do antígeno para DCs (SINGH et al., 2000).

Desta forma, este trabalho pretende avaliar o potencial adjuvante das nanopartículas lipídicas sólidas sobre histonas nucleossomais em células dendríticas murinas. Além disto, avaliar o papel protetor das histonas nucleossomais em modelo animal de infecção por *L. braziliensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA E OS DESAFIOS DA VACINAÇÃO

A introdução de sistemas de vacinação durante o último século levou a uma melhora significativa na saúde pública, juntamente com o desenvolvimento de antibióticos, água potável e práticas de higiene. Esses fatores levaram à redução drástica da mortalidade causada por várias doenças, como rubéola, tétano e difteria (RAPPUOLI et al, 2002). Dados da Organização Mundial da Saúde apontam que a cada ano, a vacinação previne cerca de 2,5 milhões de mortes no mundo, o que equivale a prevenção de cerca de 7.000 mortes todos os dias (WHO, 2017).

2.1.1 Doenças sem vacinas disponíveis

Apesar dos avanços no desenvolvimento de vacinas, ainda existem muitas doenças de alto impacto na saúde pública sem medidas vacinais, como por exemplo, tuberculose, esquistossomose, malária e leishmaniose. As razões para que essas doenças ainda não tenham vacinas disponíveis efetivas são diversas, mas pode-se destacar principalmente a alta complexidade e variabilidade antigênica desses microrganismos e a falta do completo entendimento dos mecanismos de proteção contra essas doenças (SACKS et al., 2014). Além disso, algumas destas doenças são consideradas negligenciadas, por afetarem populações mais pobres e por isso, não são priorizadas pela indústria farmacêutica com investimentos.

A história do desenvolvimento das vacinas evidencia um fato, às vezes despercebido, o de que diferentes patógenos necessitam de diferentes tipos de vacinas. Atualmente, a grande dificuldade do desenvolvimento de novas vacinas está relacionada à ativação de uma resposta imune mediada por células T. Até o presente momento, a única vacina licenciada que promove este tipo de resposta é a vacina contra BCG (Bacille Calmette-Guérin). Todas as outras vacinas disponíveis têm sua proteção correlacionada à resposta mediada por anticorpos (PLOTKIN, 2014).

Dentre as áreas do conhecimento que podem revolucionar a maneira pela quais novas vacinas serão desenvolvidas, podemos destacar: (1) a utilização de novos métodos para identificar antígenos vacinais; (2) o desenvolvimento de novas tecnologias para expressar, formular e apresentar antígenos; e (3) o uso da biologia de sistemas para compreender os mecanismos protetores envolvidos em modelos humanos e/ou animais de resistência à infecção.

Dentro do seguimento de novas tecnologias/plataformas para formular e apresentar antígenos, podemos destacar novas formas de apresentação e uso de adjuvantes. Estes sistemas apresentam grande importância quando se trata do desenvolvimento de novas vacinas, uma vez que podem levar à uma resposta imune mais adequada.

2.1.2 Resposta imune nas vacinas

A resposta imune desencadeada após a exposição a um antígeno é um fator determinante na proteção proporcionada pela vacina. Idealmente, a vacinação deve mimetizar a infecção, para estabelecer altas taxas de proteção (ROSENTHAL e ZIMMERMAN, 2006).

Respostas de perfil Th1 (inflamatória) são mediadas por linfócitos T e são necessárias para controlar infecções intracelulares (vírus, parasitos e bactérias) e infecções fúngicas. Por outro lado, a resposta de perfil Th2, que é predominantemente mediada por anticorpos, é responsável pelo controle de infecções extracelulares (ROSENTHAL e ZIMMERMAN, 2006). As células dendríticas (DC) apresentam um papel central na determinação do tipo da resposta imune que será desencadeada após exposição ao antígeno. O tipo de receptor ligante Toll (TLR) nas DCs irá determinar o perfil de citocinas liberado por estas células (Th1/Th2/Th17) (ROSENTHAL e ZIMMERMAN, 2006).

Sendo assim, a forma do reconhecimento do antígeno pelas células dendríticas é determinante na ativação do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B). A apresentação via MHC I leva à ativação de linfócitos T pela ligação ao TCR, expresso nas células CD8⁺. Desta forma, ocorre uma resposta de perfil Th1, na qual ocorre liberação das citocinas de perfil inflamatório (IFN- γ , TNF- α , IL-2). Por outro lado, a apresentação via MHC II ocorre após a fagocitose de antígenos extracelulares, e leva à ativação de linfócitos pela ligação do TCR presente nas células CD4⁺. Esta via leva a uma resposta de perfil Th2, com liberação de IL-10 e IL-4. Há também a ativação de linfócitos com B, levando a produção de anticorpos (LEO et al., 2011). Desta maneira, as diferentes vacinas devem idealmente induzir uma resposta imune com um perfil que esteja associado a proteção para o microrganismo em questão.

2.2 ADJUVANTES

A descoberta dos adjuvantes no início do século XX (1920) levou a uma melhora significativa da resposta protetora das vacinas (MCKEE et al., 2017), aumentando a imunogenicidade dos antígenos *in vivo* (O-HAGAN e VALIANTE, 2003) ou direcionando a resposta imune (REED et al., 2013). Os adjuvantes têm como função proporcionar uma resposta imune protetora, sem a necessidade de várias doses de vacinação, além de proporcionar uma resposta imune mais rápida, com maior magnitude e com subclasses de anticorpos de interesse (ORR et al., 2013).

2.2.1 Importância dos adjuvantes para desenvolvimento de vacinas

Existe uma tendência que as novas vacinas sejam compostas por apenas algumas moléculas do patógeno (e.g. proteínas recombinantes, polissacarídeos) (PLOTKIN, 2014). Nesse sentido, a pesquisa por novos adjuvantes e sistemas de entrega que melhorem a resposta aos antígenos se tornou um tema central para o desenvolvimento de novas vacinas. Fatores como segurança e tolerabilidade são avaliados quando se busca novas moléculas com efeito adjuvante. Existem poucos adjuvantes licenciados para uso em vacinas humanas nos Estados Unidos e Europa. Entre eles, podemos citar: os sais de alumínio (*Alum*), emulsões (MF59®, AS03, AS04 e AF03), AS06 (MPLA com sal de alumínio), CpG e virossomos (SHI et al., 2019).

As principais vantagens do uso de adjuvantes em uma formulação vacinal são: redução do número de doses, resposta mais efetiva de células T e resposta mais rápida ao patógeno (REED et al., 2013). Por exemplo, a adição do adjuvante GLA-SE (gluopyranosyl lipid adjuvante-stable emulson) na vacina com a proteína recombinante H5 de *Influenza* aumentou a soroconversão em 30 vezes quando comparado com o uso do antígeno isolado (COX et al., 2011). A redução do número de doses pode ser exemplificada pela adição do adjuvante AS04 à vacina contra Hepatite B que possibilitou a redução de 3 doses para 2 doses (LEVIE et al., 2002).

2.2.2 Mecanismos de ação dos adjuvantes

Apesar da utilização em várias vacinas, os adjuvantes não têm seus mecanismos de ação totalmente conhecidos. Entretanto, já existem algumas evidências de como estas substâncias

agem para melhorar a resposta imune. São elas: (1) liberação controlada do antígeno no sítio da inoculação (efeito depot), (2) recrutamento celular para o sítio da injeção, (3) regulação positiva de citocinas e quimiocinas, (4) aumento do uptake do antígeno e apresentação pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), (5) ativação de inflamossomos (AWATE et al., 2013).

O efeito “depot” é o mecanismo de ação conhecido dos adjuvantes mais antigo. O aprisionamento dos antígenos associado à liberação lenta no sítio da inoculação leva à estimulação constante do sistema imune, fazendo com que haja maior liberação de anticorpos (AWATE et al., 2013). Estudos genômicos de microarray demonstraram que genes codificantes de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão são modulados no sítio da injeção com Alum, MF59® e CpG-ODN (MOSCA et al., 2008). Além disso, foi visto que o adjuvante AS03 quando injetado com antígenos leva à produção de CSF3 (colony-stimulating factor 3), IL-6 e quimiocinas recrutadoras de leucócitos (CCL2, CCL3 e CCL5) (MOREL et al., 2011).

As células dendríticas (DC) apresentam um papel central na resposta imune, e por isso, sua ativação deve ser um ponto essencial no estudo dos adjuvantes. Em geral, os adjuvantes devem levar à maturação das DC e aumentar a expressão de MHC e outras moléculas co-estimulatórias, o que é requerido para uma ativação eficiente das células T (AWATE et al., 2013). Já foi visto que os adjuvantes completos de Freund, CpG-ODN, MF59® e AS04 levam à maturação das DCs e melhoram a ativação do sistema imune adaptativo (DE BECKER et al., 2000; SHAH et al., 2003). Células dendríticas derivadas de medula óssea quando estimuladas com micropartículas de PLGA (Poly-lactic-co-glycolic acid) aumentam a sua capacidade de apresentação de antígenos (SUN et al., 2003).

Outro mecanismo de ação dos adjuvantes é a formação de inflamassomas, que vem sendo vastamente estudada. A formação destes é induzida após o dano tecidual e morte celular causados pelos adjuvantes particulados no sítio da injeção. Esse dano leva à sinalização não específica de dano, seguida de ativação do sistema imune inato, com consequente ativação da resposta adaptiva (AWATE et al., 2013).

Patógenos diferentes necessitam de diferentes tipos de vacinas, incluindo adjuvantes e plataformas de apresentação de antígenos. Os mecanismos envolvidos na ação de cada adjuvante são importantes para o direcionamento da resposta imune desejada e um racional adequado de desenvolvimento de novas vacinas. Uma das promessas é a utilização de novos adjuvantes que permitam respostas mais potentes e de perfil Th1.

2.2.3 Tipos de adjuvantes

Os adjuvantes podem ser classificados em 3 categorias de acordo com a função que exercem, os que funcionam como imunoestimulatórios, os que agem como meio de entrega do antígeno, e os mistos. As moléculas imunoestimulatórias incluem os ligantes de receptores do sistema imune inato, como os receptores toll-like (TLR) e os receptores NOD-like (NLR), e saponinas como o QS21 (que tem mecanismo de ação pouco conhecido). Os lipossomas ou sistemas nanoparticulados e virossomos são os adjuvantes que agem pela entrega de antígenos. As partículas baseadas em lipídeos normalmente são compostas de moléculas não estimulatórias, mas que aumentam a apresentação do antígeno às células apresentadoras de antígenos e dependendo do tamanho e carga podem apresentar efeito adjuvante. Por fim, os adjuvantes mistos são uma combinação dos dois tipos citados anteriormente (REED et al., 2013).

2.2.3.1 *Sistemas de delivery nanoparticulados*

Nanopartículas (NPs) são partículas que se encontram em escala nanométrica ($< 1 \mu\text{m}$). No campo da vacinologia, as nanopartículas são utilizadas como sistemas de entrega de antígenos. Estes podem estar adsorvidos às NPs ou encapsulados (GREGORY et al., 2013). O encapsulamento de antígenos em nanopartículas tem vantagens em relação a outras metodologias, como por exemplo, proteção do antígeno, melhor apresentação e exposição prolongada do antígeno ao sistema imune. As nanopartículas podem ser utilizadas para otimizar diferentes formas de administração da vacina, como por via tópica, inalação ou ingestão (GREGORY et al., 2013). Além disso, devido a proteção do antígeno, o seu tempo de degradação é maior, o que permite uma redução da quantidade de antígeno necessário para induzir uma resposta imune protetora (SING et al., 2000).

Algumas das vantagens das nanopartículas em relação aos sistemas vacinais tradicionais se devem às suas características físico-químicas, como a composição do biomaterial, propriedades imunoestimulatórias, além do tamanho e carga de superfície destas nanopartículas. A ligação de antígenos na superfície destes sistemas proporciona uma ligação cruzada com receptores de linfócitos B, levando a uma melhor resposta mediada por anticorpos. Além disto, existem partículas que direcionam e promovem a entrega citosólica dos antígenos, o que possibilita uma melhor apresentação via MHC de classe I, o que leva à uma resposta mais

eficiente de linfócitos T citotóxicos (DE TEMMERMAN, et al., 2011; DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014; SAHDEV et al., 2014).

Na vacinologia, a apresentação adequada dos antígenos às células dendríticas (DCs) é essencial para proporcionar uma resposta imune protetora. A formulação de antígenos em nanopartículas leva a uma maior eficiência de apresentação para as DCs do que quando se utiliza antígenos solúveis isolados (UTO et al., 2011). Além da melhora na entrega dos antígenos, já foi visto que o estímulo de DCs com nanopartículas carreando ovalbumina é capaz de aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas quando comparado à proteína livre ou a proteína associada à Alum (UTO et al., 2009), o que proporciona uma maior ativação (LUTSIK et al., 2002) e proliferação de linfócitos T (MEN et al., 1999).

Entre os diversos sistemas nanoparticulados existentes, os principais utilizados na área de vacinas são os vírus-like particles (VLP), as vesículas de membrana externa (OMVs) lipossomos, ISCOMs (immune stimulating complex), nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas. Após a síntese ou extração, estes materiais devem ser caracterizados de acordo com a carga, tamanho e forma, pois além do material, estas características influenciam o tipo de resposta imune (GREGORY et al., 2013).

A primeira característica das nanopartículas que influencia no tipo de resposta imune é a carga da partícula. Foi visto por Salvador et al. (2015), que micropartículas catiônicas poliméricas (PLGA + DOTAP) contendo albumina como antígeno modelo, levam à ativação de células dendríticas *in vitro*. Além disso, foi visto que a imunização de camundongos BALB/c com essas partículas levaram a uma resposta Th1 mais robusta do que quando comparada com partículas incorporadas com outros adjuvantes como MPLA, α -GalCer e PolyI:C (SALVADOR et al., 2015). Este tipo de resultado pode ser explicado pelo fato de que partículas catiônicas (carga positiva) são melhor fagocitadas pelas células do sistema imune do que as de carga negativa devido à natureza aniônica das membranas celulares (FOGED et al., 2005).

O tamanho também é um aspecto que pode influenciar a resposta imune induzida. Apesar da falta de consenso na literatura, já foi demonstrado que a administração intranasal e oral em camundongos do toxóide do tétano em nanopartículas de tamanho entre 100 e 500 nm leva a maior produção de anticorpos quando comparado às partículas de tamanho maior (>1000 nm) (JUNG et al., 2001). Em contrapartida, foi visto por Kanchan e Panda que antígenos de Hepatite B em nanopartículas poliméricas (200-600 nm) promoveram taxas mais baixas de

anticorpos do que micropartículas (2-8 μm). Apesar disto, a imunização com nanopartículas promoveu altos níveis de IFN- γ , MHC I e anticorpos relacionados a resposta de perfil Th1, enquanto as micropartículas promoveram secreção de IL-4 e aumento de MHC II (KANCHAN e PANDA, 2007).

Outro aspecto que deve ser avaliado em relação ao tamanho das partículas é a via pela qual a partícula é endocitada pela célula dendrítica. Já foi demonstrado que partículas de até 500 nm preferencialmente são fagocitadas pela via dependente de clatrina, caveolina ou receptores específicos, o que resulta em uma resposta imune celular. Em contrapartida, partículas maiores (>500 nm) são endocitadas por fagocitose e/ou macropinocitose, o que leva à uma resposta humoral (BADIEE et al., 2013).

Desta forma, a utilização de nanopartículas como sistemas de entrega de antígeno parece ser uma metodologia promissora, para o racional de novas vacinas.

2.2.3.1.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

Existem diversos tipos de nanopartículas, dependendo do tipo de material do qual são feitas. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas de tamanho nanométrico (50 - 1000 nm) formadas por uma matriz lipídica sólida. Estas podem ser utilizadas como sistemas de liberação em diferentes áreas como *delivery* de drogas e vacinas (MEHNERT e MADER, 2001; COPLAND et al., 2005).

Em geral, as NLS consistem em lipídeos biocompatíveis (classe I) e aprovadas para uso farmacêutico em humanos. A maioria das formulações utilizam parafina ou glicerídeos biodegradáveis (Precirol ATO 5 e Compritol 888) (COPLAND et al., 2005). O Precirol ATO 5 (Glyceryl palmitostearate) é um glicerídeo de massa molar de 633 g/mol que tem seu uso licenciado para uso em humanos pelo FDA (Figura 1). É amplamente utilizado como aditivo no campo da farmacologia, e como base para formulação de nanopartículas.

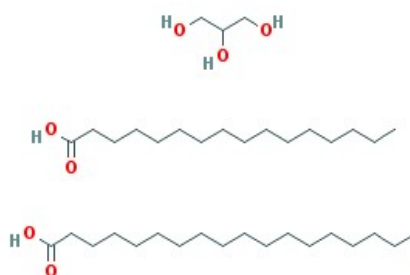


Figura 1 – Etapas de produção do Precirol ATO 5 (Glyceryl palmitostearate). O radical gliceril se liga ao palmoesterato e ocorre o alongamento da cadeia.

A NLS apresenta algumas vantagens em relação a outros tipos de sistemas lipídicos como a sua composição (lipídeos classe I) e evita o uso de solventes orgânicos durante a sua formulação (MEHNERT e MADER, 2001). Além disto, a utilização de NLS permite a incorporação de antígenos lipofílicos, na matriz lipídica ou antígenos hidrofílicos (MULLER et al., 2002). Como sistemas de entrega, as NLS catiônicas podem agir de duas formas: (1) encapsulamento do antígeno dentro da matriz lipídica; ou (2) adsorção do antígeno na superfície por interação elétrica (GHOLAMI et al., 2016).

As nanopartículas lipídicas sólidas já foram utilizadas no regime de prime-boost (DNA/parasito vivo). A vacina de DNA composta de cisteína proteases formuladas em NLSs catiônicas, seguida de um reforço com *L. tarentolae* expressando o antígeno A2 de *L. donovani*. A vacinação levou a proteção de camundongos BALB/c contra a infecção por *L. infantum*, na qual houve redução da carga parasitária, além de altos níveis de IFN- γ e redução de IL-10 (SALJOUGHIAN et al., 2013b). Outro caso de proteção foi observado por Bezerra e colaboradores em 2019, no qual NLS foi utilizado para o *delivery* de ácido retinóico junto com antígeno total de *L. amazonensis*. Foi observado proteção de camundongos BALB/c após vacina nasal contra *L. amazonensis*, retardando o crescimento da lesão e levando à redução de carga parasitária (BEZERRA et al., 2019).

Desta forma, já foi observado em alguns estudos o potencial adjuvante de NLS com antígenos de doenças parasitárias como a leishmaniose. Sendo assim, este sistema nanoparticulado apresenta um papel promissor como adjuvante para outros antígenos.

2.2.3.2 *Adjuvantes imunomodulatórios*

Além dos adjuvantes que funcionam por meio da entrega de antígeno, existem aqueles que têm sua função baseada no caráter imunomodulatório, ou seja, que vão promover a modulação da resposta imune entre Th1, Th2 e Th17. Os agonistas são um exemplo de adjuvantes imunomodulatórios (REED et al., 2013). Em geral, agonistas são substâncias que têm capacidade de ligação à receptores celulares, e que proporcionam uma resposta biológica na célula (KAISHO e AKIRA, 2006).

No campo da vacinologia, os principais agonistas utilizados como adjuvantes são os ligantes de Toll. Existem 13 receptores toll-like (TLR) em mamíferos, sendo que destes, 10 estão presentes em humanos (PETRY e GASPARI, 2009). Os TLRs são expressos em diferentes tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos, queratinócitos, células dendríticas e células endoteliais e epiteliais. Estes podem ser expressos intra ou extracelularmente e são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por exemplo, peptídeoglicanos e DNA não-metilado (KAISHO e AKIRA, 2006).

Os receptores TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 são expressos na membrana plasmática e apresentam papel essencial no reconhecimento de componentes bacterianos. Em contrapartida, os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão presentes em compartimentos intracelulares, estes são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos virais e bacterianos. Estes apresentam grande importância na resposta contra vírus por induzirem fortemente IFN do tipo I (TAKEDA et al., 2003).

Muitas das vacinas em desenvolvimento têm como alvo a resposta de células T, a qual não é induzida pela maioria dos adjuvantes com uso aprovado para humanos. Então, um dos objetivos dos novos adjuvantes é induzir células T CD4+ e CD8+ para eliminar patógenos intracelulares (REED et al., 2013). Desta forma, uma nova geração de vacinas incorporando agonistas de receptores toll-like vem sendo avaliada, o que facilitaria a resposta de células T auxiliares. Estes agonistas apresentam grande importância no desenvolvimento de vacinas contra patógenos que são controlados por respostas imunes celulares, como a malária, a tuberculose e a leishmaniose (REED et al., 2013).

Já existem alguns ligantes de TLR que se encontram em fase avançada de desenvolvimento. O primeiro deles é o MPL, um ligante de TLR4, que faz parte da vacina

contra HPV (Cervarix). Além deste, o CpG ODN (oligonucleotídeo), ligante de TLR9, faz parte de uma formulação vacinal contra Hepatite B (Hepislav) que completou o ensaio clínico fase 3 (REED et al., 2013).

2.2.3.2.1 CpG ODN

Os oligonucleotídeos CpG (ou CpG ODN) são moléculas curtas de DNA sintético de fita simples que contêm dinucleotídeos CpG não metilados em contextos de sequência específicos (motivos CpG). Esses motivos CpG estão presentes em uma frequência 20 vezes maior no DNA bacteriano do que no DNA de mamíferos. Durante uma infecção, o sistema imune inato é capaz de reconhecer este padrão de metilação via TLR9, levando à ativação da resposta imune e posterior eliminação do patógeno. No campo da vacinologia, oligonucleotídeos sintéticos que contêm motivos CpG similares aos encontrados no DNA bacteriano podem ser utilizados como adjuvantes para estimular uma resposta similar ativando o receptor Toll-like 9 (TLR9) (KLINMAN, 2004).

As principais células humanas que expressam TLR9 e por isso respondem diretamente ao estímulo por CpG são linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides. A ativação destas células pelo CpG leva a maturação e proliferação de células natural killer (NK), linfócitos e monócitos/macrófagos. Estas células secretam citocinas e quimiocinas criando uma resposta pró-inflamatória de perfil Th1 (IL-12 e INF- γ) (KLINMAN, 2004).

O domínio CpG no seu uso como adjuvante pode ser classificado em três classes. A classe A (tipo D) leva à maturação de células dendríticas plasmocitóides e secreção de IFN- α , mas não tem efeito sobre os linfócitos B; a classe B (tipo K) além da ativação de DC, promove a ativação de linfócitos B com posterior secreção de IgM; e a classe C ativa DC e leva os linfócitos B a secretarem IL-6 (BONAM et al., 2017).

O CpG já vem sendo estudado como adjuvante em diversas vacinas. Já foi demonstrado que vacina de CpG conjugado com antígeno de superfície de Hepatite B em camundongos resultou em um aumento de mil vezes na resposta de anticorpos quando comparado com o antígeno sozinho (DAVIS et al., 1998). O CpG está sendo estudado em vários ensaios pré-clínicos e clínicos em diversas doenças como Hepatite, Malária e Câncer (SHIROTA e KLINMAN, 2014).

Desta forma, o uso de CpG como adjuvante parece ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina para doenças que dependem de uma resposta celular de perfil Th1, como a leishmaniose.

2.3 AS LEISHMANIOSES

2.3.1 Impacto da Leishmaniose

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecto-parasitárias e não contagiosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. A infecção por *Leishmania* tem duas manifestações clínicas a depender da espécie causadora da doença. Sendo elas a leishmaniose tegumentar ou visceral, a primeira forma acomete a pele ou superfícies mucosas, enquanto a segunda, é caracterizada pela infecção do fígado, baço e medula óssea (MURRAY et al., 2001; ALVAR et al, 2012). No mundo, as espécies causadoras da LT são *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *L. peruviana*, enquanto *L. donovani* e *L. chagasi* são causadoras de LV. No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) é causada pelos agentes etiológicos *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Enquanto a leishmaniose visceral (LV) é causada por *L. infantum*.

A leishmaniose é a segunda doença parasitária que mais leva a óbito e, a terceira doença em anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY) no mundo (DEN BOER et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses têm prevalência em quatro continentes, apresentando mais de 12 milhões de pessoas infectadas, e 2 milhões de novos casos por ano, sendo 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar e 500 mil de leishmaniose visceral. Além disso, mais de 350 milhões estão sob risco de contrair a doença. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as que apresentam os maiores índices da doença (BRASIL, 2017). Especificamente na Bahia, a incidência média para a Leishmaniose Tegumentar (LT) em 2013 foi de 30,28 casos para cada 100.000 habitantes (SESAB/SUVISA/DIS/SINAN, 2013). Inicialmente era considerada uma zoonose de animais silvestres que, ocasionalmente, ocorria em pessoas em contato com florestas, porém vem se expandindo em regiões periurbanas.

2.3.2 Ciclo de vida do parasito

Existem diversas espécies de *Leishmania*, cada uma com características distintas. O ciclo se inicia com a transmissão do parasito na sua forma flagelada (promastigota) do inseto para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (Figura 2). Os parasitos então são fagocitados por diversos tipos de células fagocíticas, e dentro do fagolisossomo, se transformam na forma não-flagelada (amastigota). O ciclo se completa quando o flebotomíneo suga o sangue de um mamífero contaminado, ingerindo amastigotas que se transformam em promastigotas no intestino do inseto, e migram para a probóscide (BELKAID et al., 2000).

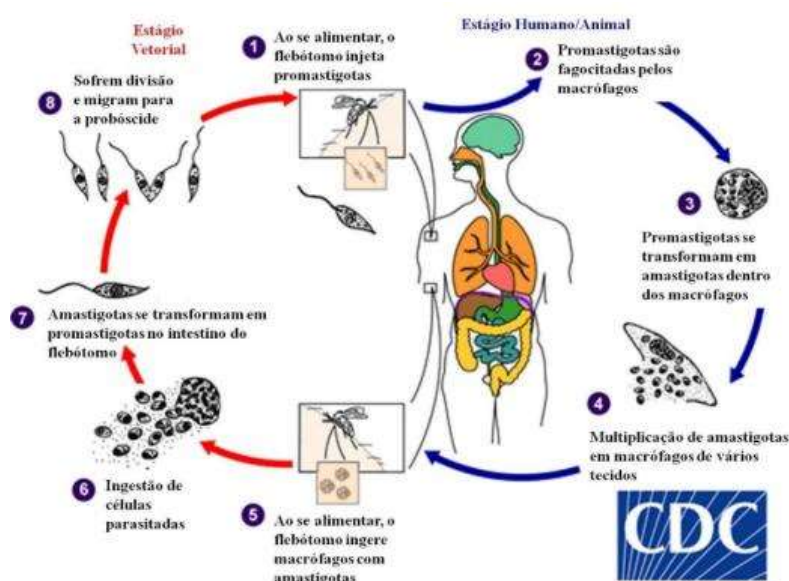


Figura 2 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Extraído e adaptado de CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

2.3.3 Resposta imune contra a leishmaniose tegumentar

A LT apresenta-se sob um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo classificada em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea mucosa (LCM), e leishmaniose cutânea-difusa (LCD). A resposta imune contra a leishmaniose tegumentar é dependente de vários fatores do hospedeiro, também da espécie infectante. A resposta envolve muitos tipos de células. Inicialmente, os neutrófilos são rapidamente recrutados ao sítio da infecção (PETERS et al., 2008). Nos primeiros dias após a infecção, monócitos inflamatórios, macrófagos e células dendríticas se tornam as células dominantes infectadas com *Leishmania* (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). Os macrófagos têm papel determinante durante a infecção, pois estes são as principais células hospedeiras para o parasito, além de agir como células apresentadoras de antígenos, secretar moléculas inflamatórias e estarem envolvidos na

imunopatologia da doença (GIUDICE et al., 2012; RIBEIRO-GOMES et al., 2014; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Na leishmaniose tegumentar, a maior presença do parasito ocorre entre a fase inicial e o pico das lesões (KUMAR et al., 2009). Especificamente em infecções causadas por *L. major*, o pico da carga parasitária ocorre antes do surgimento da lesão, o que indica que a ulceração ocorre por uma resposta inflamatória na pele, e não pela presença dos parasitos (BELKAID et al., 2000). Os mecanismos de proteção contra leishmaniose da resposta imune inata são a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos após ativação por IFN- γ e TNF- α (CARVALHO et al., 1994).

Em relação à resposta imune adaptativa, estudos utilizando modelos experimentais em murinos mostraram uma dicotomia. A resposta de perfil Th1 está associada a proteção, enquanto a resposta Th2, a suscetibilidade (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; ROSAS et al., 2005). Os linfócitos T CD4⁺ (Th1) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ) são essenciais para o controle da leishmaniose. Estas células são recrutadas para as lesões onde produzem IFN- γ que leva a ativação dos macrófagos (BELKAID et al., 2002). Já as células T CD8⁺ contribuem para morte do parasito pela liberação de granzima B (revisado em SCOTT e NOVAIS, 2016). Apesar do papel protetor das células T CD8⁺, já foi descrito que estas podem estar relacionadas a imunopatologia da doença, demonstrado pela presença de linfócitos T CD8⁺ nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea. Além disto, a progressão e metástase da leishmaniose causada por *L. braziliensis* está relacionada a células T CD8 citotóxicas (Revisado em da SILVA SANTOS e BRODSKYN, 2014).

Em modelo experimental, a resolução da infecção primária por *Leishmania* leva à imunidade contra reinfecção mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺ (LIEW et al., 1982). Entretanto, mesmo após a resolução da lesão, alguns parasitos permanecem no hospedeiro, devido à uma diminuição da resposta imune mediada por IL-10 (BELKAID et al., 2002). Essa pequena população de parasitos permanente leva a manutenção de células T CD4⁺ *Leishmania* específicas que proporcionam proteção contra reinfecção (PETERS et al., 2014).

2.3.4 Vacinação contra leishmaniose

O histórico da vacinação contra a leishmaniose remonta tempos antigos, entretanto, nenhuma vacina efetiva para humanos foi introduzida no mercado. O fato de seres humanos

desenvolverem uma imunidade protetora e de longa duração após cura de lesões cutâneas por leishmaniose, reforça a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina (OKWOR et al., 2009). Um grande impasse no desenvolvimento de uma medida profilática contra esta doença é o mecanismo envolvido na proteção. É sabido que a resposta celular é considerada chave na resistência, pela produção de IFN- γ que leva ao aumento do “burst” oxidativo pelos fagócitos (ANDERSON et al., 2005). Porém, acredita-se que a resposta Th2 não leva à doença, mas sim a falta de uma resposta Th1 (ANDERSON et al., 2005).

Muitas estratégias vêm sendo testadas para obtenção de uma resposta protetora contra a leishmaniose. A primeira estratégia a ser utilizada foi a inoculação de parasitos vivos de *L. major* em regiões não expostas da pele, a qual usualmente leva à cura espontânea da infecção após 6 a 9 meses (leishmanização). Apesar do relativo sucesso desta estratégia, questões como segurança, e a restrição do seu uso em indivíduos imunodeprimidos inviabilizaram o uso dessa estratégia (GHOLAMI et al., 2016) (Tabela 1).

A segunda estratégia seria o uso de parasitos atenuados geneticamente, neste caso, a escolha do gene deficiente é o ponto central, pois o parasito deve perder a virulência, mas preservar a imunogenicidade (Tabela 1) (GHOLAMI et al., 2016). A prova do princípio da utilização desta estratégia já foi demonstrada em modelos experimentais para diferentes genes de *Leishmania* (SPATH et al., 2003; ELIKAEI et al., 2019). Entretanto, a necessidade da presença de genes marcadores de resistência a antibióticos para a seleção dos parasitos, e a possibilidade de reversão dos nocautes são limitações que impediram o avanço desta estratégia. Recentemente, o surgimento de novas ferramentas de edição de genomas (CRISPR/CAS9) aplicáveis a *Leishmania* revigorou o uso desta estratégia, uma vez que se tornou possível obter parasitos nocautes desligando mais de um gene sequencialmente sem a presença de marcadores de seleção (ZHANG et al., 2017).

Tabela 1 - Algumas das principais estratégias utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose.

	Leishmanização	Parasitas Nocaute	Proteína Recombinante
Vantagens	- Cura espontânea - Imunidade protetora de longa duração	- Pode ser feito para diferentes genes - CRISPR/CAS9	- Elevada segurança - Única metodologia que apresenta vacina em ensaio clínico
Desvantagens	- Segurança - Dificuldade de uso em pacientes imunodeprimidos	- Necessidade de genes de resistência - Possibilidade de reversão da virulência	- Dificuldade de induzir uma resposta protetora

Além destas, ainda pode-se ressaltar o uso de veículos vivos ou químicos para a entrega de antígenos recombinantes. Dentre os veículos virais expressando antígenos exógenos em sua superfície, podemos citar o uso de vaccínia vírus expressando GP63 (protease de superfície) e LACK (*Leishmania* homologue of activated C kinase) contra *L. donovani* que levou a ativação de células T com altos níveis de IFN- γ (GUHA et al., 2013). Já entre os veículos bacterianos vivos destaca-se o uso de BCG expressando GP63 que mostrou proteção contra infecção com *L. major* em camundongos BALB/c (ABDELHAK et al., 1995). E mais recentemente, Hugentobler e colaboradores (2012) mostraram que a co-expressão de LACK e IL-12 em *L. lactis* reduz o tamanho da lesão quando administradas via oral ou subcutânea.

Os veículos químicos apresentam uma grande variedade, podem ser lipossomos, niossomos, virossomos, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas de PLGA, entre outras. Existem muitos estudos utilizando lipossomos e suas modificações. Por exemplo, estudos sobre a importância do tamanho dos lipossomos demonstraram que o encapsulamento de rGP63 em lipossomos de 400 nm resultou em redução de lesão e carga parasitária no baço em camundongos desafiados com *L. major* (BADIEE et al., 2012).

Em relação às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), uma vacina com antígenos de *Leishmania* (cysteine proteases I, II e III) sob a forma de DNA encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas (~250 nm) mostrou proteção contra infecção com *L. major* em camundongos BALB/c (DOROUD et al., 2011a). Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, utilizando cisteína proteinase I como antígeno, sob a forma de proteína recombinante encapsulada em NLS levou à proteção de camundongos C57BL/6 contra infecção por *L. major*. Foi verificada uma redução da carga parasitária, altos níveis de IFN- γ e redução de IL-4 (DOROUD et al., 2011b). Outro tipo de veículo é a formulação de nanoemulsões estáveis, que é a formulação com dois líquidos imiscíveis.

Atualmente, essa metodologia está em evidência através do seu uso combinado com agonistas de TLR4 (Monofosforil Lipídeo A – MPL), glucopyranosyl lipid A (GLA e SLA). O GLA quando usado em emulsão óleo em água leva ao aumento da produção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T (SHAHBAZI et al., 2015). Atualmente, a única vacina contra leishmaniose em ensaio clínico com resultados disponíveis é formulada com MPL-SE (MPL-stable emulsion) como adjuvante e um complexo poliproteico (LEISH-F2) contra LV. Essa formulação foi capaz de induzir proteção em camundongos desafiados com *L. donovani* e *L. infantum* (COLER et al., 2015).

Atualmente, vem se estudando estratégias alternativas para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose. Um aspecto importante na resposta imune contra a leishmaniose é a saliva do vetor. As proteínas da saliva do inseto são inoculadas juntamente com o parasito durante a transmissão natural para o hospedeiro mamífero. Algumas dessas proteínas apresentam papel imunogênico e imunomodulatório (COLLIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Neste contexto, surgiu a estratégia de vacinas de bloqueio de transmissão para controle de doenças transmitidas por vetores. Os anticorpos presentes no hospedeiro vacinado preveniriam a transmissão do parasito para o inseto vetor, o que interromperia o ciclo epidemiológico da doença. Foi visto em cães, que anticorpos contra antígenos (FML) de *L. donovani* leva à inibição da ligação de promastigotas de *L. donovani* e *L. chagasi* nas glândulas salivares de insetos *Lutzomyia longipalpis* (SARAIVA et al., 2006), reduzindo as chances de transmissão.

Apesar dos muitos estudos feitos com diversos tipos de estratégias e antígenos, há apenas duas vacinas comerciais contra LV para cães, as quais apresentam uma eficácia de 68-71% e necessitam de doses de reforço (revisado em RIBEIRO et al., 2018). Apesar disto, não existe nenhuma vacina licenciada para leishmaniose visceral ou tegumentar humana e há apenas um ensaio clínico em andamento no momento utilizando o antígeno ChAd63-KH, contra leishmaniose cutânea. Alguns antígenos já demonstraram proteção contra infecção com *Leishmania* em modelos experimentais, porém, nenhum foi capaz de levar a imunidade a longo-prazo.

2.3.4.1 *Histonas nucleossomais*

A busca por uma vacina eficaz contra a leishmaniose levou à investigação de diversos antígenos presentes no parasito. Entre os diversos antígenos estudados, podem-se ressaltar as

histonas nucleossomais (H1, H2A, H2B, H3 e H4). Essas proteínas apresentam um baixo peso molecular e alto conteúdo de arginina e lisina. Sua principal função é a ligação ao DNA e formação da cromatina em todos os organismos eucariotos (Figura 3).

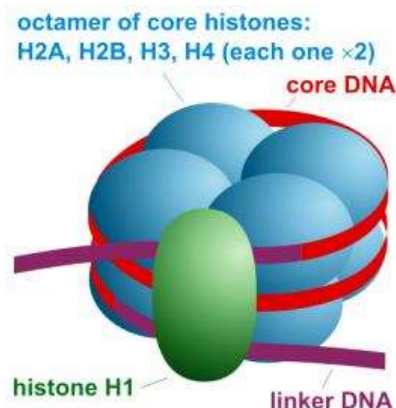


Figura 3 – Representação do nucleossomo. Este é formado por um octamero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4), ligado ao DNA e histona H1. Extraído de Stryer L (1995).

As histonas de *Leishmania* podem ser consideradas pan-antígenos (CHANG et al., 2003). Os pan-antígenos são proteínas intracelulares que entram em contato com o sistema imune após a lise do parasito. Em geral, estes antígenos formam complexos multiprotéicos, como os ribossomos e nucleossomos, por isso, o seu processamento pelas células apresentadoras de antígeno pode acontecer por fagocitose. Um fator a ser considerado é maior estabilidade destes complexos, o que promove uma melhor fagocitose que os antígenos solúveis, levando a maior capacidade de processamento das células apresentadoras de antígenos (REQUENA et al., 2000). Desta maneira, explorar o potencial imunogênico dos pan-antígenos pode ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leishmaniose.

As histonas nucleossomais são proteínas muito conservadas entre as espécies de *Leishmania*. Comparando as sequências das histonas H2A, H2B, H3 e H4 nas seguintes espécies causadoras de leishmaniose (*L. braziliensis*, *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. donovani*) é possível observar que a similaridade varia de 88 a 100% e a identidade de 78 a 98% (Figura 4). Sendo assim, a utilização das proteínas de uma destas espécies em uma vacina pode levar à proteção cruzada.

No presente trabalho, foram usadas histonas recombinantes de *L. infantum* para avaliar a proteção cruzada contra *L. braziliensis*. Desta forma, é importante saber a similaridade e

identidade destas proteínas em relação a humanos e camundongos. Foi observado que a similaridade varia entre 63 a 79% e identidade entre 44 a 60% (dados não mostrados). Entre as espécies de *Leishmania*, as proteínas H3 e H4 são as mais conservadas quando comparadas a H2A e H2B.

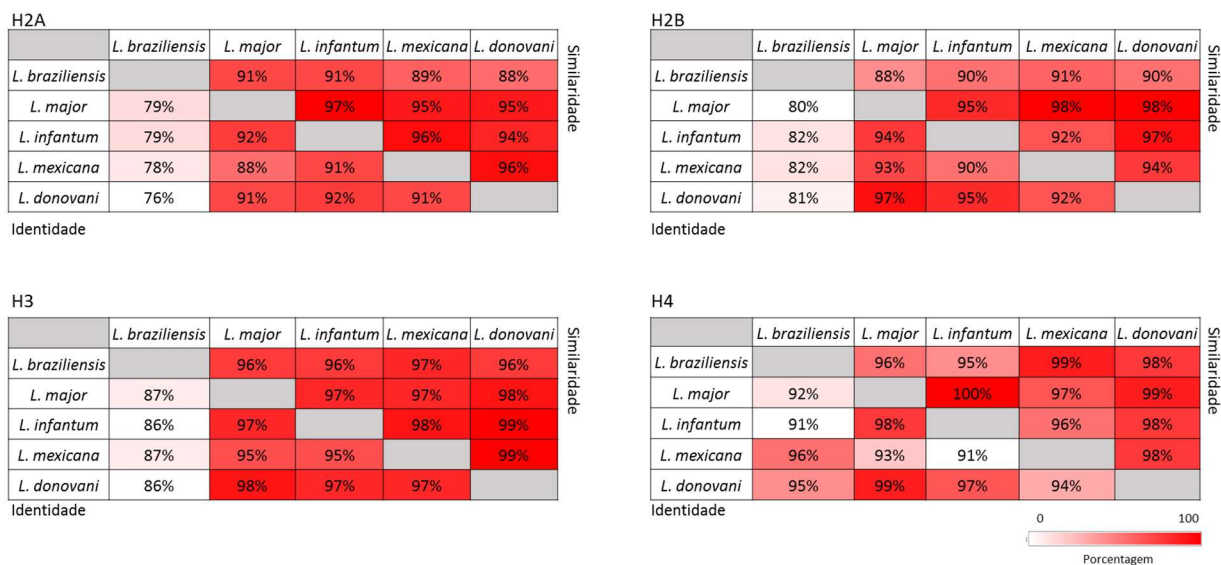


Figura 4 – Similaridade e identidade de sequência de histonas entre as espécies de *Leishmania*. Foram utilizadas as sequências de *L. braziliensis*, *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. donovani* para análise de alinhamento por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI) e obtenção das porcentagens de identidade e similaridade. (Fonte: elaboração própria).

Já foi visto que as histonas nucleossomais de *Leishmania* são identificadas pelo sistema imune de pacientes com leishmaniose. Foram detectados anticorpos contra as histonas H2A e H2B em pacientes com leishmaniose visceral (MAALEJ et al., 2003; PASSOS et al., 2005), e contra as histonas H1 e H2B em pacientes com leishmaniose cutânea (CARMELO et al., 2006). Além disso, anticorpos contra as histonas (H2A, H2B, H3 e H4) também são identificados em soros de cães com leishmaniose visceral (SOTO et al., 1999).

Apesar do alto grau de conservação visto para estas proteínas, entre diferentes espécies de eucariotos (MALIK e HENIKOFF, 2003), (similaridade em humanos – 63%; camundongos – 79%) a resposta humoral observada contra as histonas de *Leishmania* é específica, não apresentando reatividade cruzadas contra as histonas do hospedeiro (REQUENA et al., 2000). Além da resposta humoral, as histonas nucleossomais de *Leishmania* também estão envolvidas na indução da resposta imune celular. Foi demonstrado que células mononucleares do sangue

periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose cutânea quando estimuladas com H2B ou H3 são capazes de proliferar e secretar IFN- γ (DE CARVALHO et al., 2003).

Levando em consideração as características imunogênicas das histonas nucleossomais de *Leishmania*, muitos trabalhos vêm explorando estas proteínas como antígenos vacinais (Tabela 2). Na maioria dos trabalhos, os antígenos foram avaliados sobre a forma de vacina de DNA, o que levou a respostas de perfil Th1 com proteção parcial na maioria dos estudos (IBORRA et al., 2004; CARRION et al., 2008b; CHENIK et al., 2006; CARRION, 2011). Além disto, as histonas foram avaliadas utilizando combinação de vacina de DNA com proteína recombinante, desta forma, foi observado um aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* (CARNEIRO et al., 2012).

Outra metodologia utilizada para vacinação com histonas nucleossomais de *Leishmania* foi utilizar células dendríticas pulsadas com a proteína recombinante ou DNA e oligo CpG (CARRION et al., 2007; CARRION et al., 2008a; AGALLOU et al., 2012). Um dos trabalhos avaliando apenas proteínas recombinantes (H1) utilizou como adjuvante o Montanide (MASINA et al., 2003), este adjuvante apresenta limitações como não ser biodegradável, não ser muito estável no longo prazo, e em alguns casos induzir efeitos colaterais adversos (VAN DOORN et al., 2016). O outro trabalho utilizando proteína recombinante (H2B e suas porções N e C terminal) mostrou que a vacinação com o peptídeo da região N-terminal associado a CpG levou à proteção de camundongos BALB/c contra infecção com *L. major* (CHENIK et al., 2006).

Tabela 2 - Sumário de estudos realizados com histonas nucleossomais de *Leishmania*.

Modelo	Apresentação	Adjuvante	Espécie	Resposta
BALB/c	DNA	-	<i>L. donovani</i>	Redução da carga parasitária ¹
Macaco	H1 + GST	Montanide (MISA720)	<i>L. major</i>	Redução da lesão ²
BALB/c	DNA HIS	-	<i>L. major</i>	↑IFN- γ ; ↓IL-4 ³
BALB/c	H2B / H2B N-C	CpG-ODN	<i>L. major</i>	Região N-terminal é protetora ⁴
BALB/c	HIS + DC pulsada	CpG-ODN	<i>L. major</i>	↓Foxp3/IL-10/IL-4 ↑IFN- γ ⁵
BALB/c	DNA HIS + DC pulsada	CpG-ODN	<i>L. infantum</i>	Proteção parcial ⁶
BALB/c	DNA isolado ou combinado	-	<i>L. major</i>	Proteção apenas utilizando as 4 histonas ⁷
BALB/c	DNA (H2 ou H3/4)	-	<i>L. major</i>	H3 e H4 é essencial para proteção ⁸
BALB/c	H1 + GST +DC pulsada	CpG-ODN	<i>L. infantum</i>	↓IL-10 ↑IFN- γ ⁹
BALB/c	HIS-DNA ou DNA+proteína	CpG-ODN	<i>L. braziliensis</i>	↓IL-4 ↑IFN- γ ¹⁰
BALB/c	Peptídeo quimérico (CpA, H1, KMP11)	PLGA e/ou MPLA	<i>L. infantum</i>	↑IFN- γ ¹¹

CpA - cysteine peptidase A

CpG-ODN - cytosine phosphodiester guanine oligodeoxynucleotides

DC – Células dendríticas

GST - glutathione S-transferase

HIS – H2A, H2B, H3 e H4

KMP11 - kinetoplastid membrane protein 11

MPLA - monophosphoryl lipid A

PBMC – periferal blood mononuclear cells

PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

¹Melby et al., 2000, ²Masina et al., 2003, ³Iborra et al., 2004, ⁴Chenik et al., 2006, ⁵Carrion et al., 2007,

⁶Carrion et al., 2008, ⁷Carrion et al., 2008, ⁸Carrion, 2011, ⁹Agallou et al., 2012, ¹⁰Carneiro et al., 2012,

¹¹Athanasiou et al., 2017

As histonas nucleossomais de *Leishmania* apresentam potencial como antígenos vacinais. Já foi visto que elas apresentaram imunogenicidade em camundongo, cão e macaco, e em diferentes modelos, tais como leishmaniose visceral e tegumentar. Além disto, foi possível observar uma resposta imune de caráter Th1, resposta protetora contra a doença. Por fim, também já foi demonstrado que as histonas induzem proteção cruzada, proteínas de *L. infantum* protegem contra *L. braziliensis*. No entanto, pouco se sabe sobre a utilização da combinação de

4 histonas (H2A, H2B, H3 e H4) juntas sob a forma de proteínas recombinantes como candidatos vacinais contra LT.

Em resumo, novas metodologias são necessárias para o desenvolvimento de vacinas contra doenças como a leishmaniose. Já foi visto que histonas nucleossomais de *Leishmania* têm um potencial antigênico, e a associação destas sob a forma de proteína recombinante com adjuvantes como nanopartículas lipídicas sólidas ou CpG parece ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina contra esta doença. Este trabalho possui duas principais hipóteses, a primeira é que nanopartículas lipídicas sólidas apresentem um papel adjuvante sobre histonas nucleossomais, possibilitando uma maior ativação de células dendríticas com indução de resposta de perfil Th1. A segunda é que a imunização de camundongos com histonas nucleossomais associadas a CpG promove a proteção contra LT causada por *L. braziliensis*.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel protetor de histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) de *Leishmania* como estratégia vacinal contra a leishmaniose cutânea experimental causada por *L. braziliensis*.

CAPÍTULO 1 – Desenvolvimento de um sistema nanoparticulado lipídico e avaliação do efeito adjuvante sobre histonas nucleossomais de *Leishmania* em células dendríticas murinas

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 1

No contexto de desenvolvimento de novas vacinas, o uso de adjuvantes é de extrema importância. As nanopartículas são classificadas como adjuvantes de entrega. Antígenos nanoencapsulados são protegidos de degradação e podem promover uma resposta imune mais duradoura, além de serem capturados pelas células dendríticas de forma mais eficiente. Existem diversos biomateriais utilizados na fabricação de nanopartículas. Entre eles, o Precirol ATO5 é um lipídeo comumente utilizado para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas.

Neste capítulo, será abordado o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas e a avaliação do seu potencial adjuvante sobre histonas nucleossomais de *Leishmania*. A hipótese deste capítulo é que histonas nucleossomais encapsuladas nanopartículas lipídicas sólidas devem promover maior ativação de células dendríticas. Adicionalmente, partículas catiônicas induziriam uma resposta com perfil Th1, enquanto o encapsulamento em micropartículas aniônicas levaria a resposta de perfil Th2.

OBJETIVO

Desenvolver e avaliar sistemas nanoparticulados contendo histonas nucleossomais de *Leishmania* (H2A, H2B, H3 e H4) como estratégia de formulação para antígenos contra a leishmaniose cutânea experimental.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lotes de nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas e micropartículas aniônicas utilizando Precirol ATO 5 incorporadas de albumina como proteína modelo em ensaio de pré-formulação;
 - Caracterizar as partículas do ensaio de pré-formulação quanto aos parâmetros físico-químicos;
- Avaliar a entrega das nanopartículas lipídicas sólidas às células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea murina;
- Avaliar o perfil de ativação de células dendríticas após estímulo com sistema nanoparticulado.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. PRÉ-FORMULAÇÃO DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Já foi descrito (GREGORY et al., 2013) que partículas carregadas positivamente de tamanho nanométrico induzem uma resposta imune de perfil Th1, enquanto as nanopartículas com carga negativa tendem a levar uma resposta com característica mais Th2. Sendo assim, foram feitas variações na execução da metodologia previamente descrita (SEVERINO et al., 2014; FONTE et al., 2011) para obtenção de partículas nanométricas carregadas positivamente e micrométricas carregadas negativamente (Tabela 3). Neste sentido, 7 lotes (pré-formulações) foram preparados com Precirol ATO 5 (glyceryl palmistearate) gentilmente cedida por Gattefossè (Milan, Italy) através do método de emulsão múltipla água/óleo/água (A/O/A). Em seguida, com base nas formulações padronizadas e caracterizadas, foram produzidos lotes contendo albumina séria bovina (BSA) conjugada com FITC (Fluorescein isothiocyanate) ou ovalbumina (OVA). Para a produção das partículas positivas foi adicionado o polissacarídeo catiônico quitosana.

Tabela 3 - Pré-formulação partículas nanométricas carregadas positivamente e micrométricas carregadas negativamente. Em vermelho se encontram as modificações feitas em cada formulação.

	For. N°	A1	O		A2		A1/O	A1/O/A2
		β -ciclodextrina (mg/mL)	Precirol (mg/mL)	Span 60 (mg/mL)	Tween 80 (mg/mL)	Quitosana (%)	Ultraturra x (rpm/min)	Ultraturra x (rpm/min)
Nano	#1	2	100	5	6,25	0	10000/10	10000/2
	#2	2	100	5	6,25	0,5	10000/10	10000/2
	#3	2	50	5	6,25	0,5	10000/10	10000/2
Micro	#4	2	100	5	6,25	0	5000/10	10000/2
	#5	2	100	5	6,25	0	10000/10	5000/2
	#6	2	100	5	6,25	0	5000/10	5000/2
	#7	2	100	5	6,25	0	2800/10	2800/2

A1 – fase aquosa interna

O – fase orgânica - lipídeo

A2 – fase aquosa externa.

A1/O – emulsão primária

A1/O/A2 – emulsão múltipla

5.1.1 Preparação de partículas lipídicas sólidas

Inicialmente, foram feitas as solubilizações de todas as fases necessárias para a formação da emulsão múltipla. A fase aquosa interna (A1) foi preparada pela diluição de 2 mg/mL de β -ciclodextrina em 25 mL de água Milli-Q®, aquecimento à 65 °C, e adição das proteínas (BSA-FITC ou OVA); a fase orgânica (O), 100 mg/mL de Precirol ATO 5 e 5 mg/mL de Span 60 em 10 mL de Glicerol sob aquecimento a 66 °C (10 °C acima do ponto de fusão do lipídeo, 56 °C); e a fase aquosa externa (A2), 6,25 mg/mL de Tween 80 em 20 mL de água Milli-Q® ou em uma solução de 0,5% de quitosana para as nanopartículas positivas.

Em seguida, de acordo com a Figura 5, a fase aquosa interna (a 65 °C) foi adicionada lentamente à fase orgânica, e a emulsificação ocorreu durante 10 minutos sob agitação constante em diferentes velocidades com o auxílio de uma turbina homogeneizadora (T18 Digital Ultra Turrax®). Após a formação da emulsão simples, 10 mL da fase aquosa externa (A2) resfriada (3 °C) foi adicionada lentamente à emulsão pré-formada com intenção de solidificar as partículas formadas. A emulsificação ocorreu por 2 min sob agitação constante em diferentes velocidades com o auxílio de uma turbina homogeneizadora. Finalmente, os outros 10 mL da fase aquosa externa (A2) a temperatura ambiente, foram incorporadas sob agitação magnética durante 20 minutos.

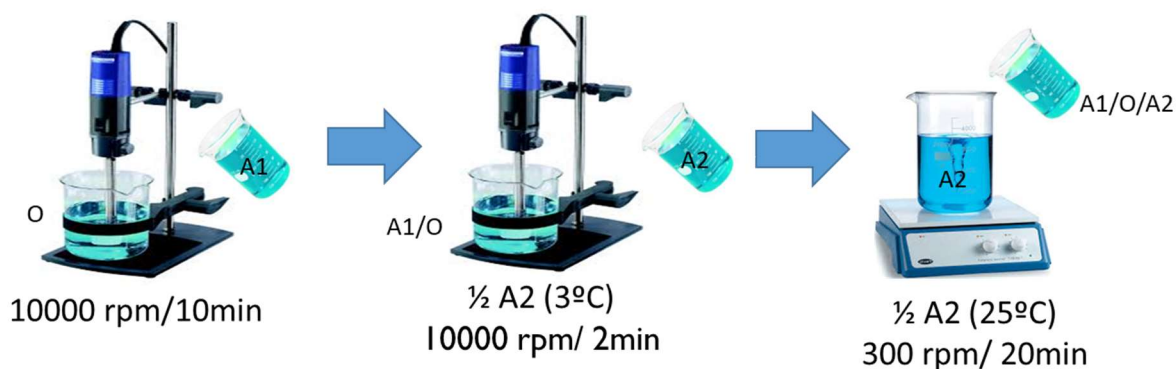


Figura 5 - Esquema de formulação de partículas sólidas lipídicas. Formulação de A/O/A em 3 etapas. Cores ilustrativas.

Após a formação completa das nanopartículas, os lotes foram diluídos (1:4) em água Milli-Q® e centrifugados a 14.000 x g a 4°C por 40 minutos (Rotor JA-14) (Beckman® Coulter Avanti J-25I). Em seguida, as partículas foram ressuspendidas em água Milli-Q® e filtradas em filtros com poros de 0.22 ou 0.45 μ m (PES Millex®). As suspensões foram armazenadas a 4 °C para posterior caracterização.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.2.1. Tamanho, Índice de polidispersão (PDI), potencial zeta

As análises de diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) à 25° C sob ângulo de espalhamento de luz de 90° em um *Zetasizer* Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) (Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente (CIENAM - UFBA). A determinação do potencial zeta (ζ) foi feita no mesmo aparelho por microeletroforese Doppler a laser. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os gráficos plotados pelo Software 7.11 (Malvern, Reino Unido). Para realização das avaliações, foi utilizada uma alíquota de 1 mL de cada lote em suspensão. Os resultados esperados para as partículas nanométricas de carga positiva e micrométricas com potencial zeta negativo se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados esperados para formulações de partículas sólidas lipídicas e poliméricas.

	POTENCIAL ZETA	DIÂMETRO MÉDIO	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO
NANOMÉTRICA POSITIVA	>20	<500 nm	<0.3
MICROMÉTRICA NEGATIVA	<-20	> 1 μm	<0.3

5.2.2 Análise morfológica

As análises morfológicas das nanopartículas foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (MET). As imagens foram feitas na plataforma de microscopia do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/ Bahia.

5.2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise morfológica das nanopartículas purificadas em suspensão foi feita utilizando o microscópio JEM-1230 (Jeol LTD, Japão). Para isso, foram utilizadas grades de Formvar, na qual foi adicionada 20 μL da amostra, após 1 minuto, o excesso foi retirado e contrastado com uranila aquosa a 2%. As amostras preparadas foram secas por no mínimo 24 horas antes de serem analisadas.

5.2.3 Estabilidade de 60 dias

A avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas foi realizada durante 60 dias com análises nos dias 0, 7, 14, 28 e 60 das amostras em suspensão mantidas a 4°C. Para isso, as nanopartículas foram homogeneizadas vigorosamente antes de cada análise. Foram repetidos os ensaios de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta de acordo com o tópico

5.3. CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A avaliação da eficiência de encapsulação das proteínas nas nanopartículas lipídicas foi feita a partir do rompimento destas com clorofórmio. Inicialmente, as nanopartículas em solução foram rompidas em clorofórmio em uma razão de 1:4 (400 µL de formulação + 1,2 mL de clorofórmio) (XIANG et al., 2011). Em seguida, as amostras ficaram sob agitação constante (Vortex Genie 2, Scientific Industries, velocidade 6) a 4 °C durante 20 minutos. Após a quebra, foi feita uma centrifugação a 8000 rpm, por 30 minutos a 4 °C, a qual resulta na formação de 3 fases, a fase inferior (clorofórmio), a fase intermediária (lipídeos), e a fase superior aquosa (proteínas). Foram feitos 4 ciclos de quebra para maximizar a remoção de lipídeos da solução. Da mesma forma, nanopartículas vazias (sem proteína) foram quebradas e utilizadas como controle negativo do encapsulamento.

A quantificação foi feita utilizando o Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Resumidamente, foi preparada uma curva padrão de um estoque de BSA para obtenção de um alcance linear de 0.5 – 200 µg/mL, o branco foi água Milli Q®. De acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, o ensaio feito em microplaca utiliza 150 µL de cada amostra ou ponto da curva. Em seguida, foi adicionado mais 150 µL do reagente de trabalho (25:24:1, Reagentes MA: MB: MC), e as placas incubadas a 37°C por 2 horas. Após o tempo de incubação, a leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) sob absorção óptica no comprimento de onda de 562 nm. A partir dos dados da curva padrão, a concentração das amostras determinada.

A eficiência de encapsulação (EE %) do BSA ou OVA nas nanopartículas foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$EE\% = \frac{1 - (\text{quantidade de BSA total} - \text{quantidade de BSA encapsulada})}{\text{quantidade de BSA total}} \times 100$$

5.4. CULTURA CELULAR

5.4.1 Células dendríticas

A avaliação da entrega das nanopartículas lipídicas sólidas foi feita pela observação da resposta das células dendríticas (DC) quando expostas às partículas. Foram utilizadas células murinas (CEUA: 020/2017). Os protocolos de isolamento e cultivo das células dendríticas foram modificados a partir de LUTZ et al., 1999. Resumidamente, os animais foram eutanaziados e tiveram os fêmures e tíbias removidos e armazenados em meio RPMI (RPMI Medium 1640 1X – Gibco®). Os ossos foram lavados com auxílio de seringa e agulha com intenção de isolar as células da medula óssea que foram centrifugadas por 10 minutos, a 4 °C, a 180 x g. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo (5% de soro fetal bovino inativado, 1% de Penicilina/Streptomicina) suplementado com os fatores de crescimento GM-CSF (10 ng/mL) e IL-4 (5 ng/mL) foram plaqueadas na concentração de 10⁶ células/poço em um volume de 5 mL e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 5 dias de cultura, o meio foi trocado e no sétimo dia, as células já diferenciadas foram processadas. As células não-aderidas foram removidas, lavadas com RPMI, concentradas por meio de centrifugação a 180 x g, 10 minutos, a 4 °C, e finalmente plaqueadas em uma nova placa (5 x 10⁵ céls/poço), na qual foram adicionados os estímulos.

5.4.2 Macrófagos

Em paralelo a análise em células dendríticas, foram feitos ensaios de entrega de nanopartículas utilizando macrófagos murinos. De forma semelhante à obtenção de DC, os macrófagos foram obtidos a partir de lavados internos da medula óssea de camundongos BALB/c (protocolo CEUA 021/2017). Neste caso, o meio foi suplementado com 30% (v/v) de sobrenadante de cultura de células L929 como fonte de M-CSF, e o lavado foi plaqueado em placas de Petri (10 mL/placa) e incubado durante 7 dias a 37 °C com 5% de CO₂. No sétimo dia, as células foram desaderidas das placas utilizando 1 mL de uma solução de RPMI a 0,25% (p/v) de tripsina e 1 mM EDTA por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, 1 mL de RPMI completo foi adicionado, interrompendo a ação da enzima. Então, os macrófagos foram centrifugados a 405 x g por 10 minutos a 4 °C e em seguida lavados em salina. Em seguida, as células foram ressuspensas e plaqueadas (5 x 10⁵ cels/poço) e após um período de 24 horas de incubação, os estímulos foram adicionados à cultura.

5.5. ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS

Para a avaliação da internalização das nanopartículas lipídicas incorporadas com BSA-FITC, estas foram adicionadas a cultura de células dendríticas e macrófagos (500 μg NP/ 5×10^5 céls) e após 24 horas, as células estimuladas com nanopartículas aderidas em lamínulas de poly-L-lisina foram fixadas com 2% de PFA (Paraformaldeído) durante 15-20 minutos e marcadas. O núcleo foi marcado com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI (4',6-diamidino-2'-fenylindole dihydrochloride) (Sigma Chemical Company) e o citoesqueleto com 50 ng/mL Faloidina-TRITC (P1951, Sigma Chemical Company) em 0.3% de Triton X-100 e PBS 1X, overnight à temperatura ambiente. Foram feitas 3 lavagens com 0.3% de Triton X-100 e PBS 1X, por 10 minutos, cada. As lâminas foram montadas utilizando glicerol 90% em 10% de PBS 1x e 100 mM de N-Propil Galato. Por fim, as células foram visualizadas por microscopia confocal (SP8, Leica), no aumento de 63x, utilizando o laser de 355 nm para o DAPI (filtro de emissão 440 (40) nm), 488 nm para o BSA-FITC (filtro de emissão 520 (30) nm) e 555 nm para a Faloidina (filtro de emissão 590 (34) nm). O escaneamento foi otimizado utilizando um detector híbrido.

5.6. ENSAIO DE ATIVAÇÃO

Além da avaliação da internalização das nanopartículas lipídicas pelas células dendríticas, também foi avaliado o perfil de expressão de moléculas dessas células após a exposição às nanopartículas. Para este ensaio, foi utilizado a Ovalbumina (OVA) como proteína modelo, visto que esta é amplamente empregada na avaliação de ativação de células dendríticas (LUO et al., 2017).

Resumidamente, as células já diferenciadas foram plaqueadas numa concentração de 5×10^5 células/poço e estimuladas com as nanopartículas positivas ou negativas, carregadas com 30 – 50 ng de OVA ou não, com as proteínas na forma livre ou LPS, como controle positivo. Após 48 horas de exposição, as células foram marcadas e adquiridas em FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) e os dados foram analisados através do software FlowJo (Ashland, OR). Foram avaliados os seguintes marcadores: MHC II; CD80; CD86; CD40.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) com os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os dados de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e dos parâmetros de estabilidade entre dois tipos lotes (nanocápsulas vazias e carregadas) foram avaliados por comparação de médias através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. No ensaio de ativação foi realizada a ANOVA seguida de pós teste de Dunnett. Para ambos os ensaios, o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

Visando avaliar o potencial adjuvante do biomaterial (Precirol) em um sistema de entrega de antígenos, foram delineados experimentos para comparar formulações de partículas nanométricas (150 – 500 nm) com carga positiva versus partículas micrométricas (3,0 – 4,0 μm) com carga negativa. A hipótese inicial é que as nanopartículas devem promover uma maior ativação de células dendríticas. Sendo que NPs catiônicas devem induzir uma resposta com perfil Th1, enquanto as micropartículas negativas devem gerar uma resposta de perfil Th2.

6.1 ENSAIOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Com a finalidade de avaliar o potencial adjuvante das partículas lipídicas, foram formulados 7 lotes de partículas nanométricas de carga positiva e partículas micrométricas de carga negativa, através do método de emulsão múltipla descrita por Severino et al (2014). Para cada lote produzido foram avaliados o diâmetro médio, o índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta, buscando alcançar parâmetros físico-químicos ideais. Além disso, foram feitas análises morfológicas dos lotes através de microscopia eletrônica de transmissão.

6.1.1 Partículas nanométricas de carga positiva

Inicialmente, foi realizado um lote de nanopartículas (150 – 500 nm) lipídicas sólidas seguindo o método descrito por Severino et al (2014), seguindo as condições descritas na Tabela 3 (formulação #1). Após a realização da centrifugação e filtração em filtros de 0,22 μm , foi feita a análise em zeta-size. A formulação obtida apresentou uma classificação monomodal, com z-average de 194,8 nm, um PdI de 0,24 e o potencial zeta de -28,6 (Tabela 5). Além disso, a análise por microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou partículas de caráter esférico (Figura 6). Apesar dos dados satisfatórios de tamanho e índice de polidispersão, o potencial zeta apresentou carga negativa. Com o objetivo de positivar a carga da superfície das partículas, foi feita uma modificação na fase aquosa externa com a adição de Quitosana a 0,5% de acordo com FONTE et al., 2011.

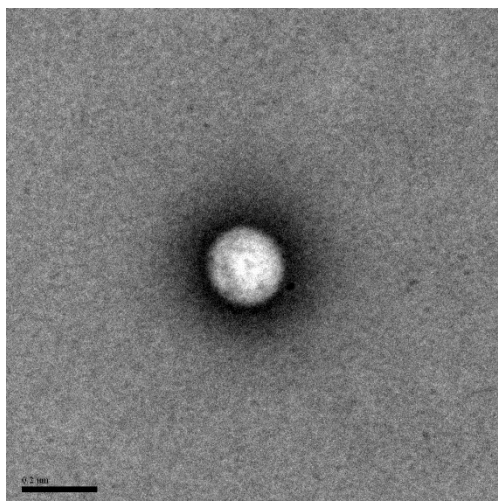


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartícula lipídica sólida. A imagem representa uma partícula característica da formulação #1. A barra representa 0,2 μm .

Desta forma, foram feitos dois lotes com intenção de obter a formulação ideal. Foram utilizadas as condições estabelecidas para a formulação #1 (Materiais e métodos - Tabela 3) como ponto de partida, já que esta preparação apresentou uma população mono dispersa (PDI menor que 0,3), porém com carga negativa. Todos os resultados representados (Tabela 5) estão relacionados às formulações filtradas em filtros de 0,22 μm , visando à obtenção de amostras mais puras.

Tabela 5 - Resumo dos resultados da pré-formulação das partículas nanométricas de carga positiva.

Form. N°	Z-average (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mv) \pm DP*
#1	194,8	0,24	-28,6 \pm 5,9
#2	263,0	0,47	+60,2 \pm 6,9
#3	343,2	0,42	+56,0 \pm 5,7

*As medições foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

A primeira formulação feita utilizando a Quitosana (#2) apresentou um resultado de z-average de 263,0 nm, com aumento do índice de polidispersão. O aumento do tamanho era esperado devido à adição das cadeias de quitosana à superfície das partículas. Em relação ao potencial zeta, a quitosana foi eficiente em tornar as partículas positivas, apresentando um valor de +60,2 mV (Tabela 5), resultado esse que garante maior estabilidade à formulação, pois potenciais zeta mais elevados leva a repulsão entre as partículas.

Em seguida, foi feita uma nova formulação (#3) diminuindo a concentração de Precirol para 50 mg/mL (Tabela 3), com intenção de tornar a preparação mais homogênea, pois acreditava-se que a heterogeneidade da amostra estava relacionada a restos de lipídeos que não formaram partículas. Entretanto, o resultado obtido foi muito similar ao da formulação #2 (Tabela 5). Sendo assim, os parâmetros da formulação #2 foram mantidos como padrão para as próximas etapas. Para verificar a reprodutibilidade do processo, foram feitas novas formulações sem ou com albumina. Os resultados se demonstraram reprodutíveis em relação aos parâmetros de z-average, índice de polidispersão e potencial zeta (Anexo 1).

Após a padronização feita, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão para verificar a morfologia das partículas. As imagens capturadas mostraram que as partículas apresentam uma elevada eletrodensidade, pois se apresentam escuras e forma circular (Figura 7). Em todas as amostras analisadas foram observadas partículas isoladas (Figura 7A) e partículas aglomeradas (Figura 7B).

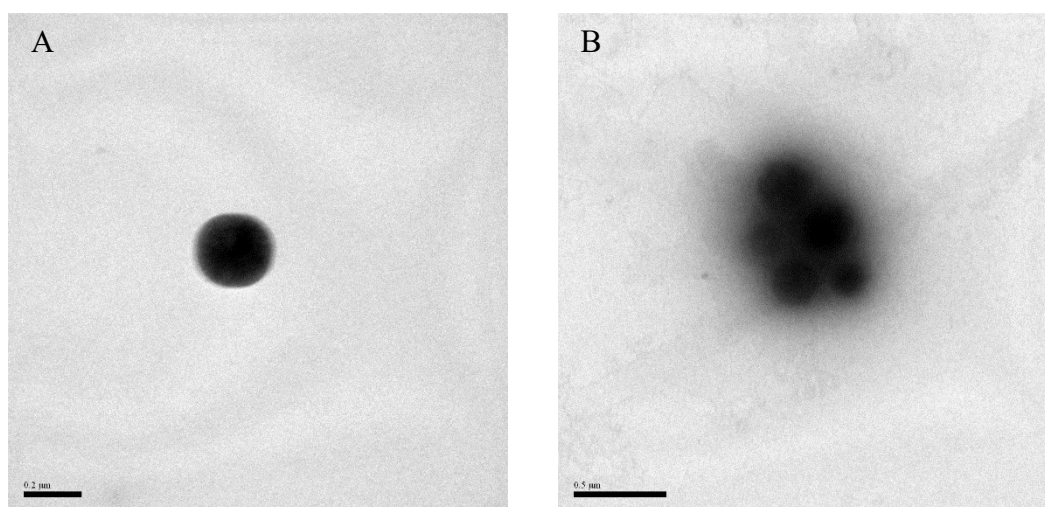


Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão representativas da formulação #2, partículas nanométricas catiônicas após filtração em filtro de 0,22 μm. (A) A barra corresponde a 0,2 μm. (B) A barra corresponde a 0,5 μm.

6.1.2 Partículas micrométricas de carga negativa

A formulação de partículas micrométricas de carga negativa foi feita a partir de mudanças na formulação #1. A estratégia utilizada com intenção de aumentar o tamanho das partículas para um valor micrométrico foi a redução da velocidade de cisalhamento aplicada. As formulações #4 e #5 tiveram a velocidade reduzida para 5000 rpm na formação da emulsão simples (A1/O) e múltipla (A1/O/A2) respectivamente (Tabela 3). Ambas as formulações

passaram por processo de filtração (para recuperar apenas partículas maiores que 450 nm). Apesar dos altos valores de Z-average encontrados para ambas as formulações, 3064 nm e 4384 nm respectivamente (Tabela 6), os valores de diâmetro médio não foram condizentes (dados não mostrados) e as formulações apresentaram um alto índice de polidispersão, o que demonstra a elevada variabilidade de tamanho no lote. Desta forma, foram reduzidas a velocidade em ambas as fases de produção das emulsões (emulsão simples e múltipla) (Tabela 3, formulações #6 e #7).

Tabela 6 - Resumo dos resultados da pré-formulação das partículas micrométricas de carga negativa.

Form. N°	Z-average (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mv) ± DP*
#4	3064	1,0	-29,4 ± 6,5
#5	4387	1,0	-31,7 ± 5,9
#6	7032	0,85	-23,8 ± 5,6
#7	5621	0,36	- 22,4 ± 6,5

*As medições foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Desta forma, as formulações #6 e #7 tiveram suas velocidades de cisalhamento reduzidas para 5000 e 2800 rpm, respectivamente, e passaram pelo processo de filtração para recuperação de partículas maiores que 450 nm. Como resultado, foi observado que a formulação #6 não teve resultados de Z-average e diâmetro médio condizentes, o que é confirmado pelo alto valor de PDI (Tabela 6). Então, a análise das amostras dessa formulação após o processo de filtração em microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstra que nenhuma partícula característica foi identificada (Figura 8A). Já a formulação #7, teve um resultado congruente em relação ao Z-average e o diâmetro médio, com valor de PDI de 0,36 (Tabela 6). Então, foi feita a caracterização da amostra após a filtração utilizando o MET, e o resultado obtido foi surpreendente. Após a filtração, não foi observado nenhum tipo de partícula em tamanho e formatos esperados (Figura 8B).

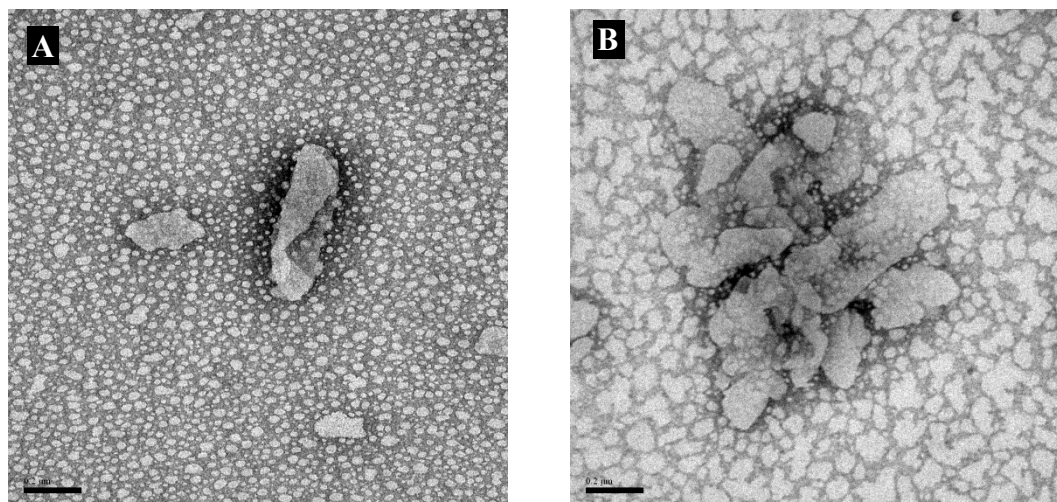


Figura 8 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. (A) Formulação #6 após filtração reversa em filtros de 0,45 μm . (B) Formulação #7 após filtração reversa em filtros de 0,45 μm . As barras correspondem a 0,2 μm .

A faixa de detecção de tamanho do Zetasizer Nano S90 é de 0,3 nm – 5 μm , a presença de materiais com tamanho muito próximo ao limite torna a análise da amostra não confiável. Desta forma, concluímos neste bloco experimental que não foi possível a obtenção de partículas micrométricas sob as condições avaliadas.

Em função desta limitação metodológica, os objetivos foram readequados, e foi feita apenas a avaliação do efeito da carga (positiva versus negativa) de nanopartículas (150 – 500 nm) em experimentos *in vitro* com células dendríticas. Neste novo contexto, a formulação #1 foi escolhida, já que apresentou valores satisfatórios de PDI e potencial zeta como formulação de partida para os novos ensaios. Foram feitas duas repetições utilizando os parâmetros desta formulação, com a adição ou não de OVA na fase aquosa interna. O resultado das repetições foi satisfatório, apresentando z-average condizente com o diâmetro médio e o PDI menor que 0,3 (Anexo 2).

Ao final dos ensaios de pré-formulação foi possível obter a padronização da produção de nanopartículas lipídicas sólidas de carga negativa e positiva. O próximo passo foi avaliar o potencial adjuvante destas partículas em cultura de células dendríticas e macrófagos. Inicialmente, foram utilizadas partículas vazias ou carregadas com BSA-FITC.

6.2. ESTABILIDADE ATÉ 60 DIAS

Após a padronização das formulações das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de carga positiva e negativa, foi avaliada a estabilidade destas carreando ovalbumina durante 60 dias. Para tanto, as formulações foram mantidas a 4 °C e avaliadas no dia 0, 7, 14, 28 e 60 utilizando o Zeta-size. Em relação às NLS negativas, o tamanho se manteve estável em relação a todos os aspectos avaliados (z-average, índice de polidispersão e potencial zeta) durante todos os dias avaliados (Tabela 7).

Em relação a estabilidade da NLS positiva, o tamanho se manteve estável até o último dia da análise (60). Entretanto, em relação ao índice de polidispersão, foi observada uma redução estatisticamente significativa no dia 28. Já o potencial zeta se manteve sem mudanças estatisticamente significantes até a última análise, na qual houve uma redução significativa, indicando que perda de estabilidade, já que quanto maior o potencial zeta, maior é a estabilidade da formulação. Após as análises, foi possível concluir que a formulação de NLS negativas se mantém estáveis por pelo menos 60 dias, enquanto as NLS positivas têm estabilidade até 28 dias.

Tabela 7 – Estabilidade de nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas e aniônicas durante 60 dias.

Dia	Negativa			Positiva		
	Z-average (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	Z-average (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
0	239,5	0,27	-23,6	304,9	0,46	+ 48,6
7	174,7	0,2	-18,5	245,0	0,41	+ 47,5
14	323,3	0,23	-10,4	366,5	0,39	+ 46,4
28	194,3	0,25	-30,2	220,9	0,28*	+ 44,2
60	356,1	0,46	-15,2	337,0	0,37	+36,2*

Todos os resultados foram feitos em triplicatas. Os resultados estão expressos como média. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. As amostras foram mantidas a 4 °C, e foram feitas medidas nos dias 0, 7, 14, 28 e 60. * p<0.05 em relação ao dia 0.

6.3. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Inicialmente, a determinação da eficiência de encapsulamento foi feita utilizando NPs encapsuladas com Albumina. Nanopartículas carregando a proteína ou vazias foram quebradas utilizando clorofórmio, e inicialmente a concentração foi determinada apenas após um ciclo de quebra. Como resultado, a concentração proteica nas partículas aniônicas foi de 5,1 $\mu\text{g/mL}$, o que corresponde a uma eficiência de encapsulamento de 19,7%. Em relação às partículas positivas, não foi possível determinar a concentração proteica, já que a interferência das partículas vazias foi mais alta que das partículas carregando proteína

Então, foram adicionados 3 novos ciclos de quebra com a intenção de maximizar a remoção da interferência dos lipídeos para ambas as formulações. Após a adição das novas etapas, uma concentração de 14,85 $\mu\text{g/mL}$ foi encontrada, correspondendo a uma eficiência média de encapsulamento de 59,2%.

6.4. AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DAS NLS POR MACRÓFAGOS E DC

A avaliação da internalização das nanopartículas lipídicas sólidas por macrófagos e células dendríticas foi feita pela exposição das células à NLS contendo BSA-FITC, numa concentração teórica de 1 μg de proteína para cada 5×10^5 células, por 24 horas. Em relação aos macrófagos, foi possível observar a presença do BSA-FITC dentro das células em ambos os grupos, tanto no grupo com nanopartículas negativas (Figura 9B), quanto com nanopartículas positivas (Figura 9C).

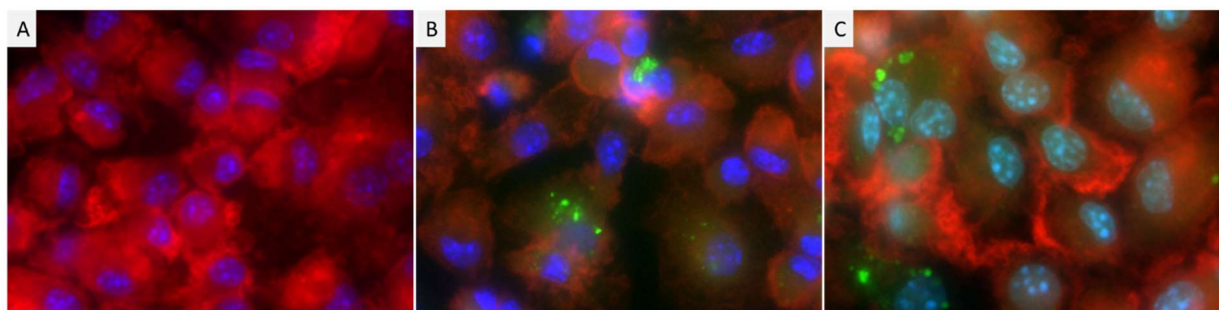


Figura 9 – Microscopia de fluorescência invertida de macrófagos murinos tratados com nanopartículas lipídicas sólidas por 24 horas. (A) Meio; (B) NLS negativa; (C) NLS positiva. Imagens obtidas no microscópio invertido de fluorescência. Vermelho – Faloidina-TRITC; Azul – DAPI; Verde – BSA-FITC.

Já em relação às células dendríticas, após o mesmo tempo de exposição e utilizando os mesmos lotes de nanopartículas, a presença de fluorescência verde nos grupos tratados tanto com nanopartículas positivas quanto negativas foi muito discreta. Só foi possível a identificação de poucas células contendo BSA-FITC (Figura 10C e D) quando comparado ao grupo tratado com BSA-FITC livre (Figura 10B). Além disso, a morfologia das células, expostas as NLS, observada ao final do experimento foi distinta, com células mais arredondada quando comparado aos grupos controle (meio) e BSA-FITC livre.

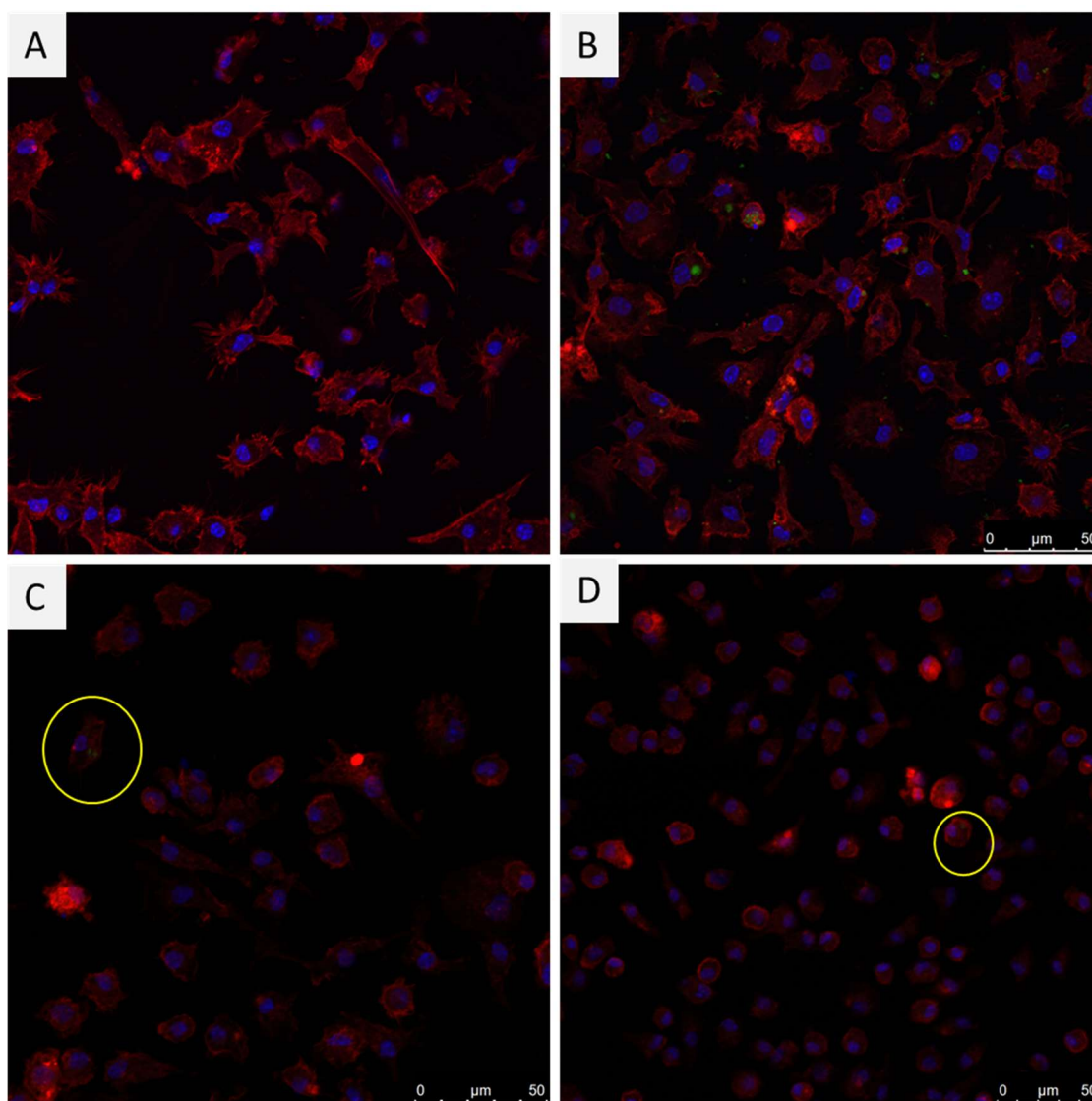


Figura 10 - Microscopia confocal de células dendríticas murinas tratadas com nanopartículas lipídicas sólidas contendo BSA-FITC por 24 horas. (A) Meio; (B) BSA-FITC livre; (C) NLS negativa; (D) NLS positiva. Vermelho – Faloidina-TRITC; Azul – DAPI; Verde – BSA-FITC. As imagens foram tiradas em aumento de 40x.

6.5. ENSAIO DE ATIVAÇÃO

Em paralelo a avaliação da internalização das nanopartículas pelas células dendríticas, foi realizado um ensaio piloto para avaliar o perfil de expressão de moléculas nas células após exposição a nanopartículas contendo Ovalbumina por 24 horas. A primeira molécula avaliada (Fig 11A) foi o CD40, que está presente em células apresentadoras de antígenos (APC) e é responsável pela ligação ao CD154 (CD40L) em linfócitos, a expressão desta molécula indica ativação celular. O estímulo com ovalbumina encapsulada em nanopartículas não resultou no aumento significativo deste receptor em relação ao meio. Entretanto, a Ovalbumina livre apresentou um aumento significativo da expressão de CD 40 quando comparado ao meio, assim como o estímulo com LPS.

Em seguida, foi avaliado o CD80 (Fig 11B) que juntamente com o CD86 (Fig 11C) tem um papel importante na sinapse imunológica entre APCs e linfócitos B e T, o que leva a ativação, proliferação e diferenciação destas células. Em relação ao CD80, não foi possível notar diferenças entre os grupos. Já o CD86 apresentou expressão significativamente elevada nos grupos tratados com OVA (forma livre) e LPS, e uma expressão similar entre o controle negativo (RPMI) e os grupos tratados com nanopartículas.

Por fim, foi analisado a expressão de MHC II (Fig. 11D). Esta molécula é constitutivamente expressa em células apresentadoras de antígeno, e a presença desta molécula confirma a conversão dos monócitos em células dendríticas. Neste caso, não houve diferença estatística na expressão desta molécula em nenhum dos grupos.

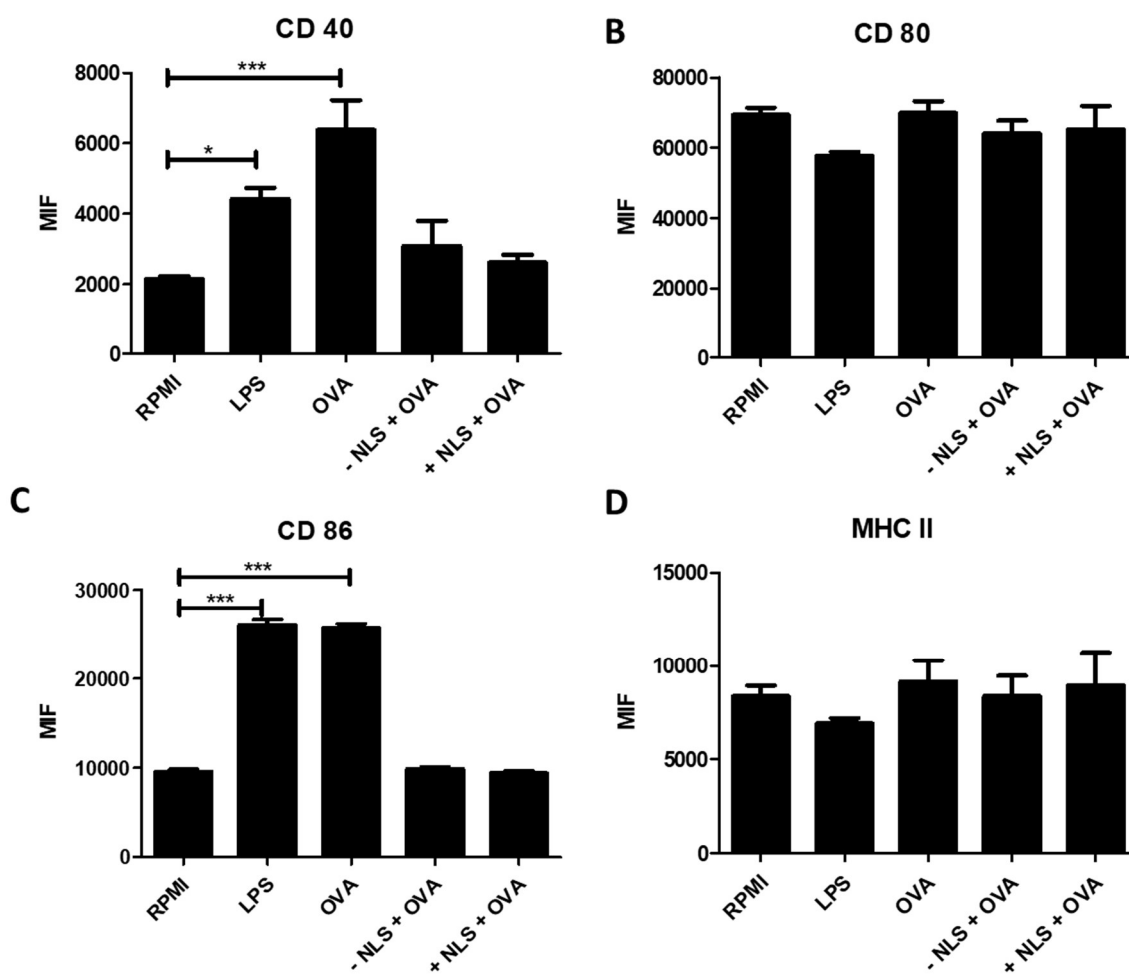


Figura 11 – Citometria de fluxo de células dendríticas murinas após exposição a nanopartículas. RPMI – controle negativo; LPS – controle positivo; OVA – Ovalbumina livre; -NLS + OVA – Ovalbumina encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas de carga negativa; +NLS + OVA – Ovalbumina encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas de carga positiva. Análise estatística: ANOVA seguida de pós teste de Dunnett

7. DISCUSSÃO

A leishmaniose é a segunda doença parasitária que mais leva a óbito no mundo (DEN BOER et al., 2011). O tratamento para a leishmaniose cutânea reside em poucas drogas, as quais apresentam desvantagens, como toxicidade e dificuldade de aplicação. Diante deste quadro, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a busca de novos alvos de drogas e vacinas para a erradicação da doença. O desenvolvimento de uma vacina efetiva envolve dois fatores principais, o antígeno e o adjuvante escolhidos. Os adjuvantes possibilitam a formação de uma resposta imune adequada mais rápida e de maior magnitude, além de reduzir a necessidade das doses de vacinação (ORR, et al., 2013).

No campo dos adjuvantes, as nanopartículas vêm se mostrando promissoras, agindo como sistemas de entrega do antígeno, além de protegê-lo e aumentar a exposição do antígeno ao sistema imune (GREGORY et al., 2013). Desta forma, neste capítulo foi investigado o papel adjuvante de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) sob células dendríticas de camundongo. Foram avaliados dois parâmetros das NLS, o tamanho e a carga. A hipótese levantada é que o estímulo de células dendríticas com partículas devem promover uma maior ativação. Além disto, as partículas em tamanho nanométrico e de carga positiva levariam a uma resposta de perfil Th1, ao passo em que as partículas micrométricas de carga negativa promoveriam uma resposta de perfil Th2.

Inicialmente, foram feitos lotes de formulação com base na metodologia previamente descrita por Severino e colaboradores, 2014. Os resultados obtidos demonstraram que houve formação de nanopartículas, mas com um maior potencial zeta ($|28,6|$ mV), quando comparado ao descrito por Severino ($|3,6|$ mV), devido ao aumento da concentração de lipídeo. Este resultado demonstra uma maior estabilidade da formulação obtida em virtude do acréscimo da repulsão entre as partículas - que ocorreu por consequência do aumento da carga. Em contrapartida, foi necessário a adição de uma etapa de filtração (filtro de $0,22 \mu\text{m}$), assim como descrito por McCarron e colaboradores em 2008, pois a formulação após a centrifugação apresentava um caráter altamente polidisperso (trimodal) com 3 grupos de partículas de tamanhos distintos.

Posteriormente, com intenção de positivar a carga das nanopartículas, foi adicionado quitosana a fase aquosa externa, conforme descrito por Fonte et al., 2012. Esta modificação levou a mudança no potencial zeta da formulação para carga positiva. Além disto, a análise de

microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a adição de quitosana torna as partículas com caráter mais eletrodenso, conforme o descrito por Fonte et al., 2012.

Por fim, foram feitas modificações nas velocidades de formação das partículas com o intuito de aumentar o tamanho das partículas, devido à redução na força de cisalhamento. Já foi visto que a redução de velocidade de 1000 rpm para 500 rpm na produção de micropartículas lipídicas sólidas seguindo a metodologia de emulsão múltipla leva a um aumento no tamanho das partículas produzidas, de 90 para 170 μm (CORTESIA et al., 2002). Entretanto, a aplicação desta estratégia isoladamente não se mostrou eficaz em aumentar o tamanho das partículas. Já que a formulação com a menor velocidade testada (2800 rpm) não se mostrou eficaz em formar partículas.

Desta forma, pode-se destacar alguns fatores. O primeiro deles é a diferença entre as velocidades utilizadas durante os ensaios e o descrito na literatura para produção de micropartículas por emulsão dupla. Cortesia e colaboradores (2002) utilizaram uma velocidade máxima de 1000 rpm. Assim como, McCarron e colaboradores que utilizaram as velocidades de 600 e 1300 rpm para preparação de micropartículas. A redução efetuada de 10.000 rpm para 2.800 rpm não foi suficiente para aumentar o tamanho das partículas.

Outro fator importante foram os emulsificantes utilizados durante a formulação, Cortesia e colaboradores (2002) utilizaram Polaxamer 407 e álcool polivinílico (PVA). Além disto, a concentração dos emulsificantes é um fator a ser considerado, a partir do método e emulsão múltipla, Kim e colaboradores (2017) também utilizaram Tween 80 como emulsificante, mas em uma concentração de 3%, aproximadamente 5 vezes maior do que a utilizada em nossas formulações (0,63%).

Além dos fatores metodológicos de formulação, um outro aspecto que traz um viés às formulações de micropartículas é a caracterização pelo *Zeta-size* Nano ZS90. Este aparelho apresenta uma faixa de detecção entre 0,3 nm e 5 μm (Malvern Panalytical), e a presença de partículas maiores do que o previsto pela faixa pode levar a resultados não confiáveis. O uso de aparelhos como o Mastersize (detecção de 0,01 a 3500 μm) seria o mais indicado para a caracterização deste tipo de formulação.

Desta forma, levando em consideração os fatores citados anteriormente, não foi possível obter êxito na formulação de micropartículas. Sendo assim, foi avaliado apenas o fator da carga no potencial adjuvante destas partículas. Após esta padronização, foi realizado o ensaio para

mensurar a eficiência de encapsulamento (EE%) da albumina das formulações (positiva e negativa). A eficiência determinada (59,2%) teve um valor dentro da faixa esperada quando comparado a Severino e colaboradores (2014), na qual foram encontrados valores entre 38 e 81% de EE% para insulina em NLS.

Em seguida, foi feita a avaliação da internalização e ativação de células dendríticas após a exposição as nanopartículas lipídicas. Após a exposição das DCs às NLS observamos uma reduzida internalização quando comparada ao BSA-FITC livre. Um dado que chamou a atenção foi a morfologia das células após a exposição às NLS, caracterizada por células em formato mais arredondado. Alguns tipos de lipídeos já se mostraram tóxicos em células apresentadoras de antígeno, a viabilidade celular destas células foi inversamente proporcional a concentração de partículas na cultura (SCHÖLER et al, 2002).

Em relação a ativação das células dendríticas após a exposição por 48 horas às nanopartículas, não foi observado aumento de nenhum dos marcadores avaliados quando comparado ao grupo de células não estimuladas. Pouco se sabe sobre a influência de nanopartículas lipídicas sólidas sobre células dendríticas. Barbosa e colaboradores (2016) observaram que nanocápsulas lipídicas feitas de Mygliol-812 foram internalizadas em células dendríticas maduras e imaturas após 1 hora de incubação. Além disto, não foi observada citotoxicidade nestas células.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de internalização e ativação não foi possível observar nenhuma atividade adjuvante das nanopartículas em relação às proteínas no estado livre. Desta forma, foi decidido avaliar a resposta protetora da imunização com histonas nucleossomais no estado livre juntamente com o agonista para TLR9 (oligo CpG) com posterior infecção por *L. braziliensis*.

CAPÍTULO 2 – Avaliação do efeito protetor das histonas nucleossomais como antígenos vacinais em associação com CpG ODN utilizando o modelo cutâneo de *L. braziliensis*

APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 2

Neste capítulo, será abordado duas estratégias vacinais em modelo murino de infecção por *L. braziliensis*. A primeira estratégia avaliada foi o uso da combinação de histonas nucleossomais de *Leishmania infantum* com Oligo CpG. Já foi visto que as histonas em forma de uma combinação de vacina de DNA com proteína recombinante, leva a um aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-4 em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* (CARNEIRO et al., 2012). Além disto, o efeito do CpG se assemelha a resposta causada pela presença de DNA bacteriano (KLINMAN, 2004). Desta forma, esta estratégia parece ser promissora para o desenvolvimento de uma resposta protetora de perfil Th1.

Além desta estratégia, o uso de parasitos nocaute como estratégia vacinal ganhou novo impulso após o advento da tecnologia CRISPR/CAS9. O racional se baseia na remoção de genes essenciais a virulência ou a replicação do parasito, sem a adição de genes marcadores de seleção (antibióticos), o que tornaria os parasitos seguros para ensaios de vacinação podendo gerar imunidade protetora. Neste capítulo, foi utilizado uma *Leishmania infantum* nocaute (*Li* Δ lpg) para o gene LPG2 (JESUS-SANTOS et al., 2020). Este gene é essencial na síntese de fosfoglicanos, que são adicionados a superfície do parasito (LPG) ou são secretados (PPGs). Os fosfoglicanos contribuem para invasão e sobrevivência da *Leishmania* dentro da célula hospedeira, sendo considerado um importante fator de virulência (MORADIN & DESCOTEAUX, 2012; GAUR et al., 2009). Desta forma, foram avaliadas duas estratégias vacinais promissoras.

OBJETIVO

Avaliação do potencial protetor de histonas nucleossomais de *Leishmania* associado a CpG e *Li Δlpg* no contexto imunização e posterior desafio por *L. braziliensis*.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento da lesão na orelha de camundongo imunizados com histonas nucleossomais ou parasitos nocautes (*Li Δlpg*) e desafiados com *L. braziliensis*;
- Avaliar a resposta humoral e celular de camundongo;
- Avaliar a carga parasitária nos linfonodos drenantes do sítio de infecção.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HISTONAS NUCLEOSSOMAS

9.1.1 Produção das proteínas recombinantes e antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA)

As diferentes proteínas (H2A, H2B, H3 e H4) foram gentilmente cedidas pelo grupo do Dr. Manuel Soto (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain).

Para a produção dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* os parasitos foram cultivados até a fase estacionária. Então, foram lavados em tampão fosfato (PBS), ressuspensos em 1 ml e transferidos para criotubo. Em seguida, passaram por 15 ciclos de congelamento em gelo seco e descongelamento em banho-maria a 37 °C. Após esta etapa, foi feita uma sonicação por 20 minutos. Por fim, foi feita uma centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi quantificado por BCA (SCOTT et al., 1987).

9.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Com intenção de verificar a concentração e grau de pureza das histonas foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A concentração das proteínas foi estipulada a partir de uma curva padrão de BSA. O gel de resolução a 17% e o gel de empilhamento a 5% foram preparados como descrito por Sambrook e colaboradores (1989) utilizando um sistema vertical de eletroforese (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, Canadá) seguindo as recomendações do fabricante.

Após o final da corrida do gel, este foi fixado (60% de etanol absoluto, 7,5% de ácido acético glacial) durante 20 minutos. Em seguida, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue G-250 a 0,25% (Sigma Aldrich®) durante 1 hora. Então, o gel foi descorado (5% de etanol absoluto, 7,5% de ácido acético glacial) até a total resolução das bandas.

9.2 CULTIVO DE PROMASTIGOTA DE *Leishmania*

9.2.1 Cultivo de promastigota de *L. braziliensis* para desafio

A avaliação da proteção das histonas nucleossomais foi feita a partir da imunização e posterior desafio de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*. Para tanto, foi necessário o cultivo da forma infectante do parasito. Promastigotas da linhagem de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram mantidas em cultura *in vitro* em meio Schneider suplementado com 10% (V/V) de SFB (soro fetal bovino), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2mM de L-glutamina em estufa incubadora B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 27 °C. As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura até 4 passagens, sendo novamente isoladas a partir de modelo animal (camundongos BALB/c) quando necessário.

9.2.2 Cultivo de promastigota de nocautes de *L. infantum* Δlpg2 para imunização

A fim de realizar a imunização com *L. infantum* Δlpg2 (MCAN/BR/89/BA262), os parasitos foram cultivados *in vitro* em meio HOMEM suplementado com 10% (V/V) de soro fetal bovino, 100 U/ml de 100 µg/mL de estreptomicina e 2mM de L-glutamina em estufa incubadora B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 27 °C. As promastigotas foram mantidas em cultura até atingir a fase estacionária (5 a 6 dias após a passagem). Para a imunização, os parasitos foram contados em câmeras de Neubauer.

9.3 ENSAIO IN VIVO

Para o ensaio de proteção *in vivo* foram utilizados 27 camundongos fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz. Todos os procedimentos realizados nesse ensaio foram aprovados pelo CEUA da instituição (protocolo 024/2019). O cronograma de imunizações e infecção foi realizado de acordo com a Figura 12.

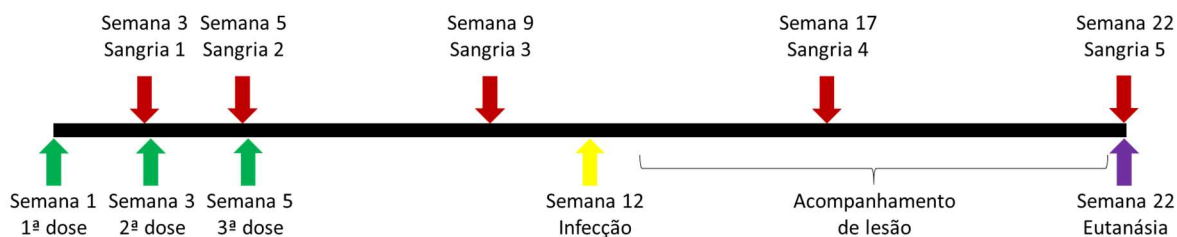


Figura 12 – Cronograma de imunizações e infecção representada por semanas.

Inicialmente, os camundongos foram divididos em 4 grupos: salina, CpG, histona + CpG, e *L. infantum* Δ lp g 2. Os grupos controles receberam apenas salina ou CpG (3 doses). O grupo histona + CpG recebeu 3 doses de 20 μ g de histonas (5 μ g de cada proteína) e 20 μ g de CpG, e um grupo controle recebeu apenas salina. Foram feitas 3 imunizações subcutâneas com auxílio de agulha 27,5 G com intervalo de 15 dias. Os animais do grupo *Li* Δ lp g foram imunizados uma única vez na terceira semana com 3×10^6 parasitos/animal por via intraperitoneal. Após as imunizações foi realizada a coleta de sangue pelo plexo orbital para obtenção de soro. Na semana 12, foi feito o desafio. A infecção nos animais foi estabelecida por um modelo que mimetiza a patologia humana. Os camundongos foram inoculados com auxílio de agulha de 27,5G, na orelha esquerda, com promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (10^5 parasitos em 10 μ L de PBS).

Nas 10 semanas seguintes à infecção foi feito o acompanhamento do desenvolvimento das lesões, para tanto, as espessuras das orelhas foram medidas semanalmente com o auxílio de um paquímetro até a eutanásia dos animais na 22ª semana. Ao fim da 10ª semana após a infecção, os animais foram eutanasiados com 240 mg/Kg de Tiopental intraperitoneal. Os linfonodos foram removidos para ensaios de diluição limitante. Além disto, o baço foi removido para o isolamento dos esplenócitos para o ensaio de resposta celular.

9.4 ENSAIO DE DILUIÇÃO LIMITANTE

Além do acompanhamento da progressão das lesões após a vacinação, foi avaliada também a carga parasitária nos linfonodos dos animais eutanasiados. Para a determinação da carga parasitária nos linfonodos, estes foram macerados individualmente em meio RPMI suplementado (10% SFB + 1% de Gentamicina e Estreptomicina) em eppendorfs com o auxílio de pistilos. Os macerados dos órgãos foram transferidos para tubos Falcons com 3 mL de salina, e em seguida centrifugados a 1600 x g por 10 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspenso em 1

mL de RPMI completo e foi feita uma diluição seriada em placas de 96 poços, para tanto, inicialmente, 20 μ L de células foram adicionados a 180 μ L de meio Schneider suplementado e assim por diante. Os resultados foram representados pela quantidade de parasitos livres para cada tratamento.

9.5 ENSAIO DE RESPOSTA IMUNE

9.5.1 Produção de anticorpos após imunização

A avaliação da produção de anticorpos após a imunização foi feita através do método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Para isso, o sangue dos animais foi coletado de 2 a 4 semanas após as imunizações, e o soro foi isolado e congelado a -20°C até o uso. Para a realização do ensaio, foram feitos pools com os anticorpos dos animais. Inicialmente, foi feita a sensibilização da placa utilizando 100 μ L de tampão (Carbonato-bicarbonato, 0,1 M, pH 9,6) contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de histonas nucleossomais (1,25 μg de cada), a placa foi incubada em câmara úmida a 4°C por 16-18 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com 200 μ L de tampão de lavagem (PBS pH 7,2 + 0,03% Tween 20). Após a lavagem, foi adicionado 150 μ L do tampão de bloqueio (PBS pH 7,2 + 5% (p/v) de leite desnatado) e foi incubado por 2 horas a 37°C .

A lavagem dos poços foi repetida, e em seguida foi adicionado 100 μ L do soro em diluições a partir de 1/80 até 1/160.000 para realização da titulação dos anticorpos. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Mais uma vez, foi feita a lavagem dos poços. Então, foi feita incubação por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário nas seguintes diluições: 1:2000 de anti-IgG-HRP (Santa Cruz Biotech), 1:1000 de anti IgG1-HRP (Invitrogen), e 1:2000 de anti-IgG2a-HRP (Invitrogen), seguindo as recomendações dos fabricantes. Após esta etapa, a placa foi lavada novamente (5x) e foi feita revelação utilizando 100 μ l por poço de TMB. Por fim, a reação foi interrompida utilizando 50 μ l por poço de 1M H_2SO_4 . A densidade óptica (DO) foi medida a 450 nm em um leitor de ELISA (Modelucar Devices, Spectra Max 190) automatizado. A titulação dos anticorpos foi determinada pela concentração na qual foi atingida uma densidade óptica (DO) de 0,1.

9.5.2 Resposta imune de esplenócitos reestimulados

Os baços foram coletados e transferidos para eppendorfs contendo meio RPMI incompleto. Os baços foram macerados individualmente com auxílio de pistilo e Cell Strainer acoplado a tubo Falcon. Foi feita a lavagem com 3 mL de RPMI, e centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água de injeção, para romper as hemácias presentes, rapidamente (aproximadamente 10 segundos), foram adicionados 10 mL de RPMI completo. Foi feita uma segunda lavagem, e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de RPMI completo. As células foram contadas em Trypan Blue e plaqueadas em unicata (200 µL) em placas de 48 poços, 5 x 10⁵ células/poço em unicata. As células foram incubadas com 150 µL de histonas (4 µg/mL/cada – 16 µg/ml), ou SLA (15 µg/ml), e meio como controle negativo. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 72 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado em -80 °C até o dia da análise.

Para a dosagem das citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α , foi utilizado kit inflamatório CBA (BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. Utilizando placa de 96 poços, foram plaqueados 25µl de mix e 25µl da curva padrão de concentração (0 – 5000 pg/mL). Foram transferidos 25µl de amostras de esplenócitos estimulados e foi feita uma incubação por 2 horas T.A. com 25µl de reagente de detecção PE em todos os poços. Em seguida, foi feita a lavagem com centrifugação a 1500 rpm/ 5 min/ 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as beads ressuspensionadas em 200µl de tampão de lavagem. A aquisição das beads foi feita por citômetro LSRFortessa (BD Biosciences). A análise foi realizada no software FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA) e as concentrações das citocinas estimadas a partir da curva de calibração

9.6 PROPOSTA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) com os resultados expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA com teste post hoc de Tukey, para o ensaio de tamanho de lesão, foi avaliado a área sobre a curva. Valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

10. RESULTADOS

10.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HISTONAS NUCLEOSSOMAIS

As proteínas recombinantes de *L. infantum* expressas em *E. coli* foram purificadas pelo grupo do nosso colaborador Manuel Soto através de cromatografia de afinidade ao Níquel, seguida de uma etapa de troca iônica. As proteínas foram dialisadas em PBS 1x, pH 7,0. Então, essas proteínas foram caracterizadas em relação à presença de endotoxinas e peso molecular em eletroforese em gel de poliacrilamida.

10.1.1 Características físico-químicas das histonas nucleossomais

As histonas nucleossomais foram expressas de forma recombinante em *E. coli*. A Tabela 8 apresenta as sequências das proteínas expressas em fusão com cauda de histidina (sublinhado). Estas apresentam um peso molecular muito similar variando entre 12 e 16 KDa. Além disso, histonas nucleossomais apresentam uma elevada carga positiva, devido sua propriedade de ligação ao DNA que tem carga negativa (LUGER et al., 1997). O ponto isoelétrico destas proteínas (PI) é atingido em pH 11.

Tabela 8 – Características das histonas nucleossomais de *Leishmania*.

Histona	Sequência	Peso Molecular (KDa)	Nº de resíduos	Carga	Ponto Isoelétrico
H2A	<u>MRGSHHHHHHGSMATPRSAKKAAR</u> KSGSKSAKCGLIFPVGRVGGMMRRG QYARRIGASGAVYLAADVLEYLTAELL ELSVKAAAQSGKKRCLNPRTVML AARHDDDIGMLLKNVTLSHSGVVPS VSKAVAKKKGGKKGRATPSA	15,24	144	26.0	11.8364
H2B	<u>MRGSHHHHHHGSMASRSAPRKAS</u> HAHKSHRKPKRSWNVYVGRSLKAI NAQMSMSHRTMSIVNSYVNDVMER ICMEAASIVRANKKRTLGAREVQTA VRIVLPAELAKHAMAEGTKAVSSAS A	13,55	123	20.5	11.9474
H3	<u>MRGSHHHHHHGSMSTKETARAKR</u> TITSKSKKAPSGAGVKRSHRRWR PGTCAIREIRKFQKSTSLLIQCAPFQR LVREVSSAQKEGLRFQSSAIMALQE ATEAYIVSLMADTNLACIHAKRVTIQ PKDIQLALRLRGERH	16,06	142	24.5	11.9582
H4	<u>MRGSHHHHHHGSMAGKRSTDAK</u> GSQRRQKKVLRDNIRGITRGCVRRM ARRGGVKRISTEVYEEVRRVLKAYV EDIVRCSTAYTEYARKKTVTACDVV TALRKQGHIL	12,39	108	21.5	11.5404

*Dados extraídos utilizando: <http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/pepstats.html>

10.1.2 Padrão de migração das histonas em eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas foram expressas de forma recombinante, e para confirmar a integridade e peso molecular destas, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 17%. Então, foram aplicadas 4 amostras no gel de poliacrilamida, H2A, H2B, H3 e H4 respectivamente. O gel resultante (Figura 13) demonstrou que as proteínas recombinantes estão integras, e apresentam um peso molecular similar ao descrito na literatura (Tabela 8).

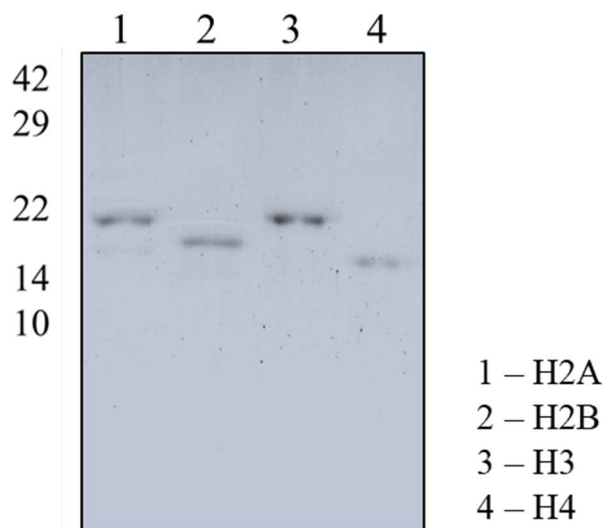


Figura 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em gel a 17%. Foi utilizado um marcador de peso molecular como controle de 10 – 175 kDa (Prism Protein Ladder – Abcam).

10.2 ENSAIO IN VIVO

O papel protetor das histonas nucleossomais de *Leishmania* associadas ao Oligo CpG e da *L. infantum* nocaute foi avaliado a partir da imunização de camundongos BALB/c e posterior desafio com *L. braziliensis*. Após a infecção, foi feito o acompanhamento do desenvolvimento da lesão por 10 semanas.

O desenvolvimento da lesão dos animais imunizados com histonas e/ou CpG se mostrou similar ao desenvolvimento dos animais não imunizados (Figura 14). Em contrapartida, a

imunização com uma única dose de *Li Δlpg* promoveu uma redução de 41% no tamanho da lesão em relação ao grupo não imunizado.

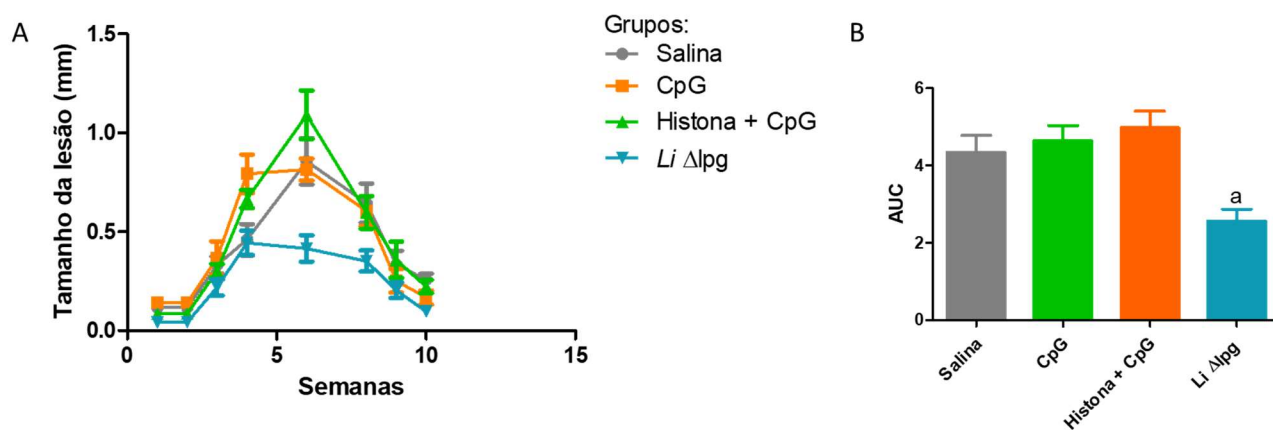


Figura 14 – Progressão da doença através das medidas do tamanho de lesão da orelha de camundongos. Os animais foram imunizados e desafiados com *L. braziliensis*. O tamanho da lesão foi aferido durante 10 semanas após a infecção com auxílio de paquímetro. (A) Curva de desenvolvimento de lesão. A espessura das lesões (em milímetros) é expressa como médias \pm SEM. (B) Área sobre a curva do tamanho da lesão. p-value < 0,05.

10.3 DILUIÇÃO LIMITANTE

Em adição ao acompanhamento do tamanho da lesão, foi feito o ensaio de diluição limitante para avaliar a proteção dos animais imunizados em relação ao grupo controle. Para isso, após a eutanásia dos animais, os linfonodos drenantes foram coletados a fim de avaliar a carga parasitária neste órgão. As placas foram incubadas em BOD, e após 15 dias de incubação foi feita a leitura das placas em microscópio invertido.

Em relação ao linfonodo drenante, foi possível observar uma redução estatisticamente significativa em todos os grupos imunizados em relação ao grupo controle (Figura 15). Quando comparado ao grupo controle, as reduções foram de 36% para o grupo CpG, 26,6% para os imunizados com Histona e CpG, e por fim, uma redução de 37,8% para o grupo *Li Δlpg*.

Além disto, foi feita uma avaliação da carga parasitária no baço dos animais imunizados com a *Leishmania* nocaute para avaliação da presença dos parasitos neste órgão. A partir do ensaio de diluição limitante, não foi possível observar parasito em nenhum dos animais.

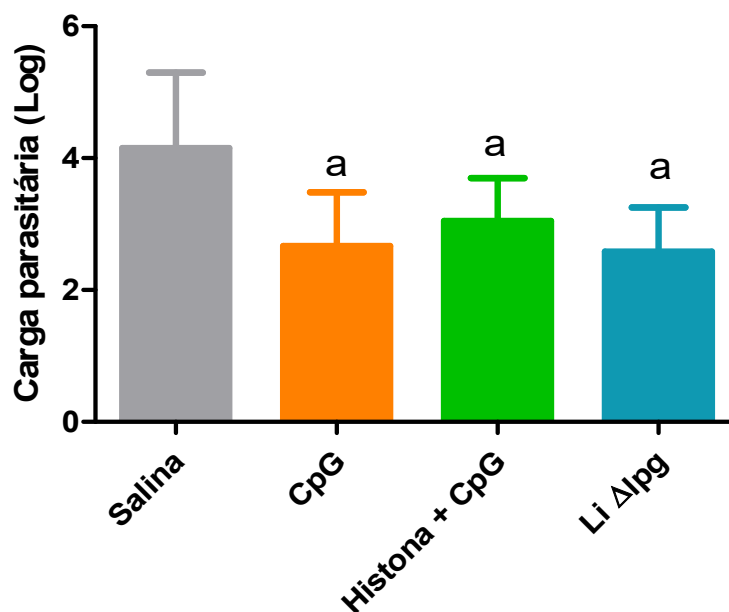


Figura 15 - Carga parasitária nos linfonodos dos grupos de animais imunizados. A carga de parasitária foi determinada no linfonodo drenante por análise de diluição limitante. Número de parasitos (em logaritmo comum, decimal) expresso como as médias \pm SD, One-Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. $p < 0,01$.

10.4 RESPOSTA HUMORAL

Além das avaliações de tamanho de lesão e carga parasitária, foi feita a coleta de sangue dos animais para avaliar a resposta imune humoral após as imunizações e o desafio. As coletas foram realizadas após cada imunização, 5 semanas após o desafio e 10 semanas após o desafio, ao término do experimento. A titulação dos anticorpos foi feita pelo método de ELISA, sendo avaliado anticorpos produzidos contra as histonas nucleossomais e o extrato solúvel de *Leishmania* (SLA).

Em relação aos níveis de IgG total foi possível observar no grupo imunizado com Histona + CpG, o aumento da titulação dos anticorpos a cada imunização (Fig. 17 A). Neste grupo, o nível dos anticorpos se manteve estável após o desafio quando comparado ao nível após a 3ª imunização. Ao final do período de infecção, houve uma redução dos níveis de anticorpos. Já nos outros dois grupos, não foi possível detectar anticorpos anti-Histonas em nenhum dos pontos experimentais analisados (Fig. 16 A).

Em relação aos anticorpos anti-SLA, foram avaliados os três grupos citados anteriormente e além disto, foi avaliado o grupo imunizado com *Li Δlpg*. Neste caso, foi

avaliado o soro de três semanas e cinco semanas após a imunização, além de sete semanas após o desafio e ao final da infecção. Todos os grupos avaliados apresentaram um aumento na produção de anticorpos após a infecção e ao final do experimento (Fig. 16 B). O grupo imunizado com Histonas + CpG apresentou um nível discretamente mais elevado após as imunizações quando comparado aos demais grupos. Ao passo que, o grupo imunizado com *Li Δlpg* revelou menores níveis de anticorpos com o decorrer da infecção.

Além da avaliação dos níveis de IgG total, foi avaliados os níveis de IgG1 e IgG2a contra SLA e histonas (Figura 16 C). Uma vez que a razão entre estes anticorpos auxilia na caracterização do perfil de resposta imune induzida pelas imunizações. Desta forma, foi avaliado o nível destes anticorpos no ponto final do ensaio (sangria terminal – 10 semanas após a infecção). É possível observar razões equilibradas IgG2a/IgG1 (igual a 1) para os grupos salina e histona + CpG contra SLA, ao passo que uma resposta de perfil mais Th1 pode ser observada nos grupos *Li Δlpg* e controle CpG (razão igual a 2). Além disto, o perfil de anticorpos específicos anti-histona, para o grupo imunizado com Histona + CpG, se mantém igual antes (dados não apresentados) e após o desafio apresentando anticorpos somente da classe IgG2a, sugerindo uma forte resposta de perfil Th1 contra estes antígenos.

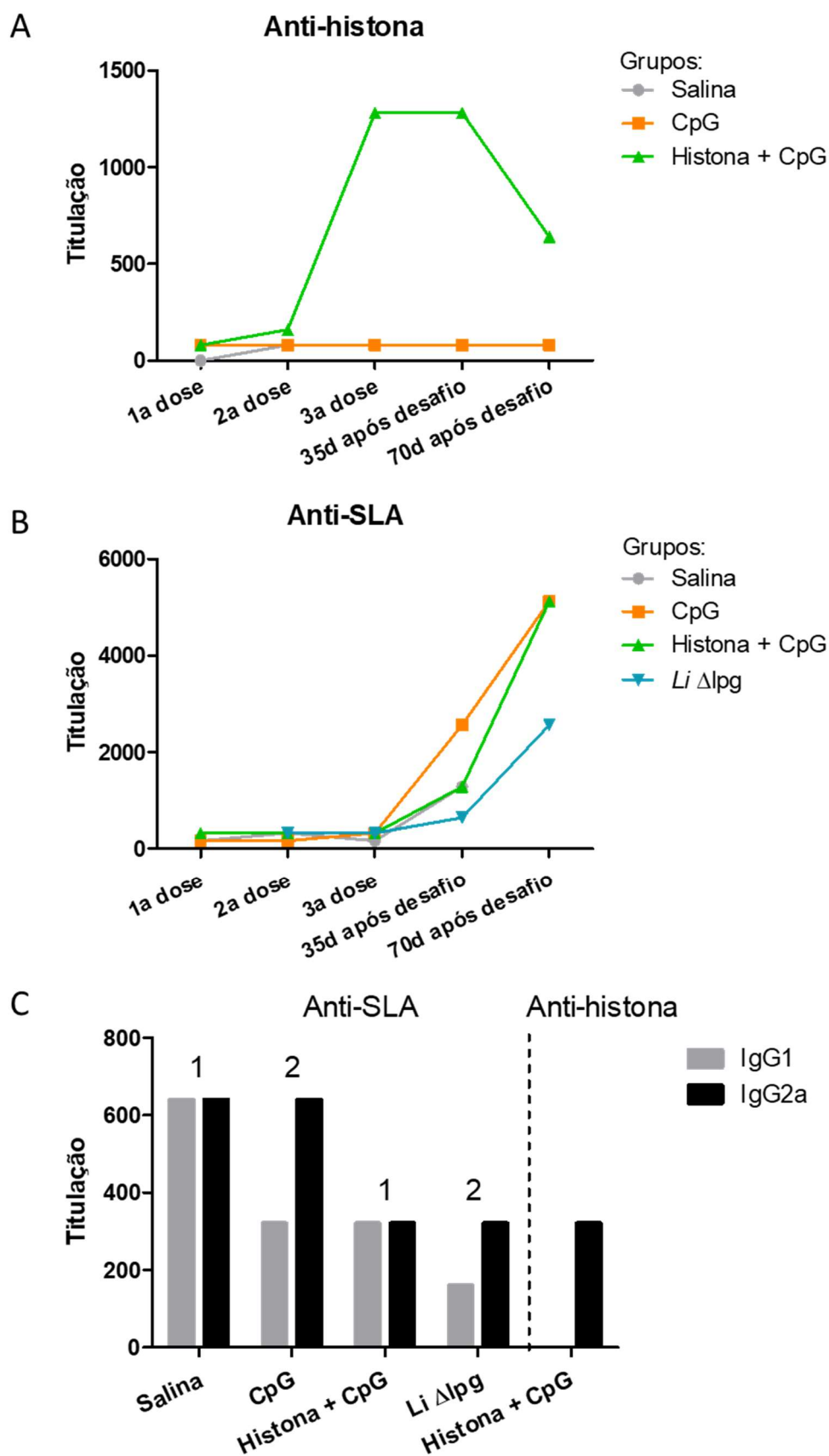


Figura 16 - Determinação da resposta humoral após imunização e desafio por ELISA. O ensaio foi realizado utilizando o pool do soro dos animais de cada grupo de cada ponto experimental. (A) Titulação dos anticorpos IgG anti-histona nucleossomal de *L. infantum*. (B) Titulação dos anticorpos IgG anti-

SLA de *L. braziliensis*. 1ª dose – 14 dias após a 1ª imunização; 2ª dose – 14 dias após a 2ª dose; 3ª dose – 28 dias após a 3ª dose; 35 dias após o desafio; 70 dias após o desafio. (C) Titulação dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SLA de *L. braziliensis* e anti-histona nucleossomal de *L. infantum*, dados referentes a sangria terminal. Os valores acima das barras representam a proporção IgG2a/IgG1.

10.5 RESPOSTA CELULAR

Uma vacina protetora contra leishmaniose requer uma resposta celular efetiva de perfil Th1. Por isso, ao final da infecção, os baços dos animais foram coletados e os esplenócitos isolados. As células foram estimuladas com histonas nucleossomais ou com extrato solúvel de *Leishmania*. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante das células foi coletado e armazenado a -80 °C até a análise. Foi feita a avaliação de 4 citocinas por CBA, foram elas: IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10, foram subtraídos os valores de citocinas produzidos por células não estimuladas para cada grupo experimental (os dados brutos estão demonstrados no Anexo 3). Para todas as citocinas avaliadas neste ensaio, não houve diferenças estatísticas entre nenhum dos grupos analisados (Figura 17).

Apesar de não haver diferenças significantes entre os grupos apresentados, quando é feita a razão entre IFN- γ /IL-10 e TNF- α /IL-10 (Figura 17E -F), é possível observar que as células dos animais imunizados com *Li* Δ lpG e reestimuladas com SLA apresentam uma menor razão entre as citocinas avaliadas quando comparada ao grupo de células dos animais imunizados com Histonas + CpG e reestimulados com histonas. Demonstrando assim, que a imunização com *Li* Δ lpG levou uma resposta mais balanceada, enquanto a imunização com histonas demonstrou uma resposta de perfil mais inflamatório.

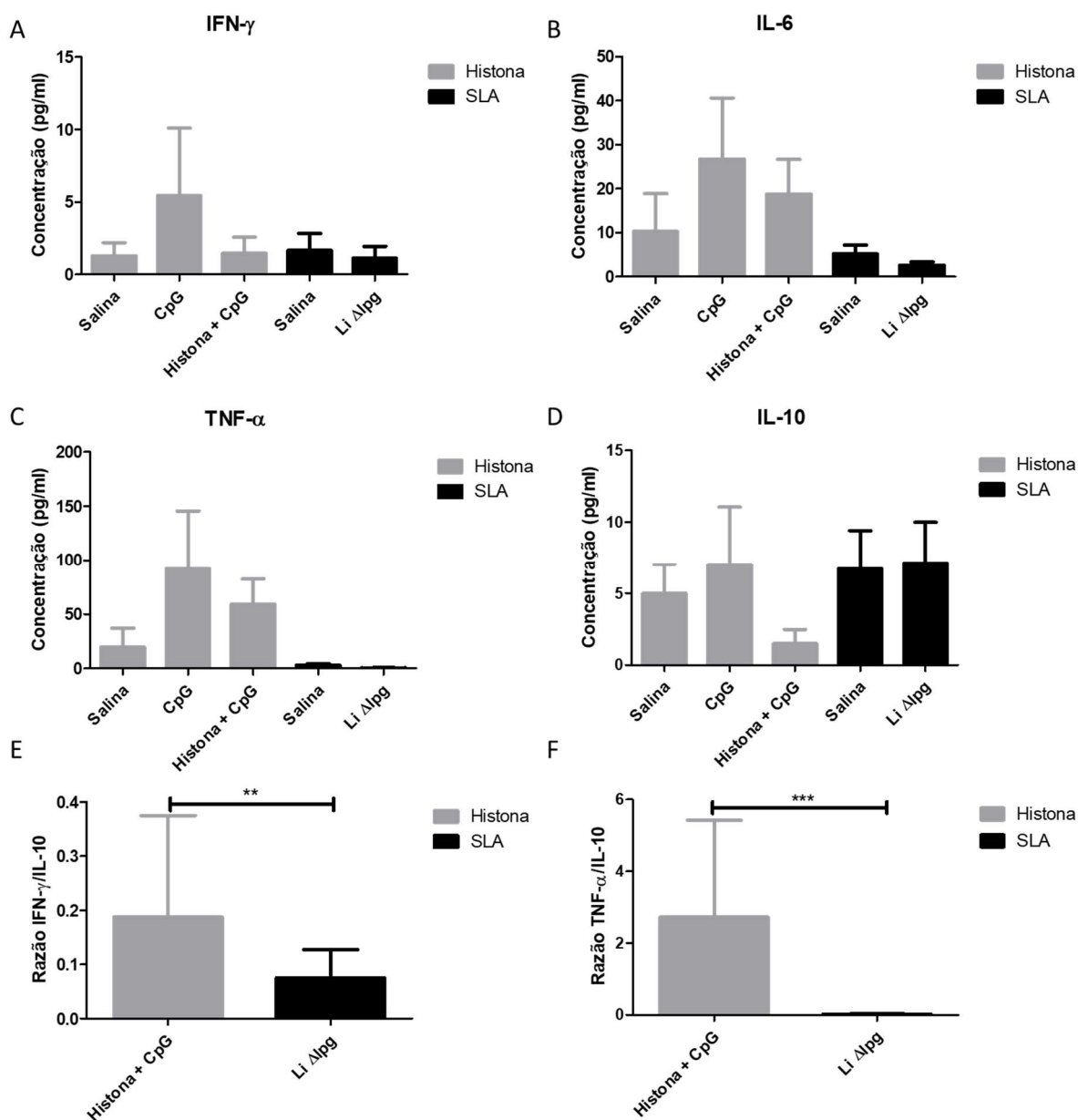


Figura 17 – Resposta imune celular de esplenócitos reestimulados. A determinação da concentração das citocinas foi feita pelo ensaio de CBA (pg/ml) e expressas pela média \pm SEM, One-way ANOVA. Os dados representam a diferença em relação ao grupo não estimulado. (E) e (F) Teste t não pareado, $p < 0,05$.

11. DISCUSSÃO

O fato de indivíduos curados contra a leishmaniose não voltarem a desenvolver a doença, reforça a ideia da possibilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra essa enfermidade (revisado em GILLESPIE et al., 2016). Desta forma, a comunidade científica tem reunido esforços para almejar uma vacina protetora contra a leishmaniose. Vêm sendo estudadas diversas metodologias, como a utilização de proteínas recombinantes, plasmídeos de DNA e parasitos mortos ou nocautes (atenuados) que mimetizam a infecção natural, sem promover o desenvolvimento da doença (revisado em REZVAN & MOAFI, 2015). Neste capítulo, foram abordadas duas destas estratégias; proteínas recombinantes e parasito atenuado de *L. infantum* como vacinas contra a infecção por *L. braziliensis*.

Com o intuito de avaliar as duas metodologias de vacinação estudadas no presente trabalho, foi desenvolvido um modelo de imunização e desafio utilizando camundongos BALB/c. Para tanto, os animais receberam 3 ou 1 dose de imunização de histonas nucleossomais ou de *Leishmania* nocaute (*Li Δlpg*), respectivamente. Em seguida, os animais foram desafiados com *L. braziliensis*. Após a infecção, o desenvolvimento da lesão foi acompanhado durante 10 semanas.

Desta forma, foi possível observar que apenas a imunização com a *Li Δlpg* levou a uma redução de 41% da AUC significativa do tamanho da lesão. Outros estudos com parasitos nocaute já vêm demonstrando proteção contra infecção. Elikae e colaboradores, 2019, observaram que a imunização de camundongos BALB/c com *L. major* nocaute para o gene p27 seguida de desafio com *L. major*, leva a uma redução significativa no tamanho de lesão quando comparada ao grupo controle.

Em contrapartida, o regime vacinal com 3 imunizações com histonas nucleossomais associadas ao Oligo CpG, não resultou na redução de lesão quando comparado ao grupo de animais não vacinados. Este resultado vai de encontro ao resultado observado por Carneiro e colaboradores, 2012. Foi observado que a associação de uma imunização com cDNA das histonas nucleossomais seguida de imunização com proteína recombinante de histonas nucleossomais de *L. infantum* associadas ao CpG levou a redução (~58%) do tamanho de lesão causada pela infecção por *L. braziliensis*. Carrion e colaboradores, 2008, também observaram redução do tamanho de lesão após 3 doses de imunização de DNA contendo as 4 histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) após desafio com *L. major*. Além disto, foi concluído que a redução da lesão só ocorre quando a vacinação é feita com DNA das 4 histonas nucleossomais.

Ao final do período de infecção, os animais foram eutanaziados, e os linfonodos drenantes foram coletados a fim de avaliar a carga parasitária neste órgão. Os resultados apresentados mostram que todos os grupos de animais imunizados tiveram uma redução significativa na carga parasitária nos linfonodos (26,7 – 37,8 %) quando comparada ao grupo não imunizado (salina). Em relação à análise dos grupos histona + CpG e CpG, não houve diferença entre eles. Este resultado levanta a hipótese de que a redução observada na carga parasitária do grupo histona + CpG pode ser derivada de um efeito inespecífico provocado pela presença deste adjuvante. Carneiro e colaboradores, 2012, observaram uma redução (~30%) na carga parasitária no linfonodo após 5 semanas de infecção no grupo imunizado com regime de prime-boost (DNA + CpG), mesmo quando foi utilizado o DNA controle (vetor vazio). Este fato reforça o efeito inespecífico provocado pela presença deste oligonucleotídeo.

Em relação ao grupo imunizado com *Li Δlpg*, também foi possível observar uma redução significativa da carga parasitária no linfonodo dos animais. Além disto, a diluição limitante dos baços não indicou a presença dos parasitos nocaute neste órgão. O que nos leva a acreditar que esta metodologia garante uma redução de lesão sem causar efeitos associados a patologia. Adicionalmente, ensaios *in vitro* utilizando estes parasitos (NOCAUTE) demonstraram redução significativa (~83%) na infecção de neutrófilos humanos quando comparado ao parasito selvagem (JESUS-SANTOS et al., 2020) Além disto, ensaios preliminares de infecções *in vivo* (BALB/c) utilizando uma carga muito mais elevada de parasitos (10^8 /animal) demonstram que o “fitness” destes parasitos é muito reduzido, quando comparado com *L. infantum* selvagem, como demonstrado pela recuperação de um porcentagem menor de parasitos (no baço) após 12 semanas de infecção em relação aos controles (Jesus-Santos, comunicação pessoal). Santi e colaboradores, 2018, observaram que o desafio com *L. infantum* nocaute para o gene KHARONI 1 (Δ Likh1) em camundongos BALB/c e C57BL/6 apresenta uma redução na carga parasitária quando comparada a *Leishmania* selvagem. Além disto, a imunização com 10^7 parasitos/animal de Δ Likh1 em camundongos BALB/c seguida de desafio com o parasito selvagem leva a redução da carga parasitária no baço e fígado quando comparado aos animais não imunizados.

A presença de anticorpos da subclasse IgG2a tem sido associada a proteção em modelos experimentais para *Leishmania* (revisado em DAY, 2007). Desta forma, foram avaliados os níveis de IgG total contra as histonas nucleossomais e SLA de *L. braziliensis*. O grupo imunizado com histonas + CpG apresentou um aumento gradativo no nível de IgG total com o decorrer das imunizações, mas que não se refletiu em uma resposta anamnésica após o desafio.

Os grupos não imunizado e imunizado apenas com CpG não apresentaram níveis elevados de anticorpo, além de não haver aumento na titulação mesmo após a infecção. Já em relação aos níveis de anticorpos contra antígenos solúveis de *L. braziliensis*, só foi possível observar aumento dos níveis de IgG total após o desafio em todos os grupos avaliados (imunizados e não imunizados).

Visando esclarecer o perfil de resposta imune induzida nos diferentes grupos experimentais, avaliamos os níveis das subclasses, IgG1 e IgG2a. É sabido que a presença de IgG1 está associada a uma resposta de perfil mais Th2, ao passo que, a maior presença de IgG2a é ligada a resposta mais Th1 (GRODELAND et al., 2015). O grupo Histonas associada a CpG apresentou um nível similar destes anticorpos, enquanto grupo imunizado com *Li Δlpg* mostrou um maior nível de IgG2a quando comparado ao IgG1. Agallou e colaboradores, 2012, demonstraram que 16 semanas após o desafio em animais imunizados com células dendríticas pulsadas com histona H1-GST e CpG apresentaram uma produção similar de IgG1 e IgG2a, demonstrando uma resposta imune mista entre Th1 e Th2. Em contrapartida, os camundongos que não apresentaram proteção têm uma dominância do isótipo IgG1. Além disto, Elikae e colaboradores (2019), demonstraram que os animais imunizados com *L. major* nocaute para o gene *p27* e desafiados com *L. major* apresentaram um maior nível de IgG2a quando comparado ao grupo não imunizado, associado a proteção, vista pela redução do tamanho de lesão e carga parasitária. Desta forma, a partir dos dados mostrados anteriormente, é possível associar uma possível proteção (redução do tamanho da lesão ou tempo de cicatrização) contra leishmaniose com um maior nível de IgG2a.

Por fim, foi feita a análise da resposta imune celular ao final do período de infecção. Desta forma, foram analisadas 4 citocinas, TNF- α , IFN γ , IL-6 e IL-10, sendo que as três primeiras são associados a uma resposta de perfil Th1 e o IL-10 é de perfil Th2/regulatório. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos avaliados, é possível observar uma menor produção de citocinas inflamatórias no grupo *Li Δlpg*, a partir da avaliação da razão entre as citocinas inflamatórias (IFN γ e TNF- α) e a citocina regulatória (IL-10). Este perfil pode estar associado a redução do tamanho de lesão após o desafio por este grupo.

Carneiro e colaboradores (2012) observaram que linfócitos TCD8⁺ isolados do linfonodo drenante após 5 semanas de infecção apresentaram uma maior presença de TNF- α no grupo de animais imunizados com DNA seguido de prime-boost com histonas recombinantes mais CpG quando comparado ao grupo não imunizado. Desta forma, seria interessante avaliar

a resposta imune nos linfonodos drenantes da orelha dos animais imunizados com Histona + CpG e *Li Δlpg*. Além disto, foi visto que esplenócitos reestimulados de animais imunizados com *L. major* p27^{-/-} apresentam uma maior produção de IFN- γ e uma redução de IL-4 quando comparado ao grupo não imunizado. Este resultado foi visto 4 ou 12 semanas após o desafio com *L. major* (ELIAKKE et al., 2019).

Em suma, é possível perceber que a imunização com histonas nucleossomais de *L. infantum* associadas a CpG não foi capaz de levar a proteção contra o desafio com *L. braziliensis*. Em contrapartida, a imunização com *Li Δlpg* parece ser mais promissora, pois levou a uma redução significativa no tamanho da lesão após a infecção com *L. braziliensis*. Apesar disto, novos ensaios para a melhor avaliação da resposta celular nos linfonodos drenantes são necessários. Além disso, é necessário a repetição do ensaio de imunização e desafio com novos controles, como a imunização com o parasito selvagem na mesma concentração do nocaute.

12. CONCLUSÕES

No presente trabalho observamos que foi possível produzir nanopartículas de carga positiva e negativa, e estas apresentaram uma estabilidade por pelo menos 30 dias. Apesar do sucesso na obtenção das nanopartículas, não foi observado efeito adjuvante sobre células dendríticas, a partir do encapsulamento de albumina. Com isso, foi avaliado a proteção das histonas nucleossomais associadas ao CpG *in vivo*.

A imunização de camundongos BALB/c com histonas nucleossomais de *L. infantum* não conferiu proteção contra a infecção por *L. braziliensis*. Enquanto a imunização com *L. infantum* nocaute para o gene LPG2 garantiu uma redução significativa do tamanho da lesão dos animais após desafio por *L. braziliensis*, caracterizada pela mudança na razão de citocinas inflamatórias em relação à citocina regulatória IL-10. A utilização de parasitos nocaute se mostrou uma estratégia promissora no desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAK, S.; LOUZIR H., *et al.* Recombinant BCG expressing the leishmanial surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Microbiology**, v.141, n.7, p. 1585-1592. 1995.
- AGALLOU, M.; SMIRLIS, D. *et al.* Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.30, n.34, p. 5086-5093. 2012.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. 1999.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v.7, n.5, p.356-71. 2012.
- ANDERSON, C.F.; MENDEZ S.; SACKS D.L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **Journal of Immunology**, v.174, p. 2934–2941. 2005.
- ATHANASIOU, E. *et al.* A poly (lactic-co-glycolic) acid nanovaccine based on chimeric peptides from different *Leishmania infantum* proteins induces dendritic cells maturation and promotes peptide-specific IFN γ -producing CD8+ T cells essential for the protection against experimental visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 684. 2017.
- AWATE S.; BABIUK, L.A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 114, 2013.
- BADIEE, A. *et al.* The role of liposome size on the type of immune response induced in BALB/c mice against leishmaniasis: rgp63 as a model antigen. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 403-409. 2012.
- BADIEE, A. *et al.* Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. **Vaccine**, v. 31, n. 5, p. 735-749. 2013.
- BARBOSA, J. P. *et al.* Nanostructured lipid carriers loaded with resveratrol modulate human dendritic cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11. 2016.
- BELKAID, Y. *et al.* A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 969–977. 2000.
- BELKAID, Y. *et al.* CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v.168, p. 3992–4000. 2002.
- BELKAID, Y. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502–507. 2002b.
- BEZERRA, I.P.S. *et al.* Nanoencapsulated retinoic acid as a safe tolerogenic adjuvant for intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 37, n. 28, p.: 3660-3667. 2019.
- BONAM, S.R. *et al.* An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 9, p. 771-93. 2017.

BRASIL. Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil, grandes regiões e unidades federativas. Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 30 de Maio de 2018.

CARMELO E. *et al.* The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts. **Parasite**, v. 13, p. 231-236. 2006.

CARNEIRO, M. W. *et al.* Vaccination with *L. infantum chagasi* nucleosomal histones confers protection against new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **PLoS One**, v. 7, n. 12. 2012.

CARRIÓN, J. *et al.* Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 6, p. 735-743. 2007.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. **Vaccine**, v. 26, n. 20, p. 2537-2544. 2008a.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: the result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines. **Vaccine**, v. 26, n. 9, p. 1155-1165. 2008b.

CARRIÓN, J. Mechanisms of immunity to *Leishmania major* infection in mice: The contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A–H2B or H3–H4). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 381-386. 2011.

CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315–325. 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 20 de Maio de 2018.

CHANG, K. *et al.* Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, n.3, p. 375-390. 2003.

CHENIK, M. *et al.* Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. **Vaccine**, v. 24, n. 14, p. 2521-2529. 2006.

COLER R.N. *et al.* Vaccination Produces CD4 T Cells with a Novel CD154–CD40-Dependent Cytolytic Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 7, p. 3190-3197. 2015.

COLLIN N. *et al.* Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathogen**, v. 5. 2009.

COPLAND, M.J. *et al.* Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 97-105. 2005.

- CORTESIA, R. *et al.* Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 23, n. 11, p. 2283-2294. 2002.
- COX, M. **Update on clinical trials evaluation of adjuvanted rHA(H5) vaccines.** In: 7th WHO Meeting on Evaluation of Pandemic Influenza Vaccines in Clinical Trials, Geneva, Switzerland, 2011.
- DALEKE-SCHERMERHORN, M. H. *et al.* Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5854-5865. 2014.
- DA SILVA SANTOS, C. ; BRODSKYN, C.I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 165. 2014.
- DAVIS, H. L. *et al.* CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **The Journal of Immunology**, v160, n. 2, p. 870-876. 1998.
- DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 2-8. 2007.
- DE BECKER, G.V. *et al.* The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigenpresenting cells. **International Immunology**, v. 12, p. 807–815. 2000.
- DE CARVALHO L.P. *et al.* Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. **Microbes Infect**, v. 5, p. 7-12. 2003.
- DEN BOER, M. *et al.* Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 17, n. 10, p. 1471–1477. 2011.
- DE TEMMERMAN, M.L. *et al.* Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 13-14, p. 569-582. 2011.
- DOROUD, D. *et al.* Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 154-162. 2011.
- DOROUD, D. *et al.* Cysteine proteinase type I, encapsulated in solid lipid nanoparticles induces substantial protection against *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 6, p. 335-348. 2011.
- ELIKAE, S. *et al.* *Leishmania major* p27 gene knockout as a novel live attenuated vaccine candidate: Protective immunity and efficacy evaluation against cutaneous and visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3221-3228. 2019.
- FOGED, C. *et al.* Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **International Journal of Pharmacology**, v. 298, p. 315–322. 2005.
- FONTE, P. *et al.* **Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery.** In: Methods in enzymology. Academic Press, 2012. p. 295-314.
- GAUR, U. *et al.* *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 182–191. 2009.

- GHOLAMI, E.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Delivery systems for *Leishmania* vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 7, p. 879-895. 2016.
- GILLESPIE, P. M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992-2995, 2016.
- GIUDICE, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 75. 2012.
- GREGORY, A.E., WILLIAMSON, D.; TITBALL, R. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 13, 2013.
- GRØDELAND, G. *et al.* Polarizing T and B cell responses by APC-targeted subunit vaccines. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. 367. 2015.
- GUHA R. *et al.* Heterologous priming–boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania (Leishmania) donovani*. **Vaccine**, v. 31, n. 15, p. 1905-1915. 2013.
- HUGENTOBLER, F. *et al.* Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection. **Vaccine**, v. 30, n. 39, p. 5726-5732. 2012.
- IBORRA, S. *et al.* Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3865-3876. 2004.
- JESUS-SANTOS, F. H. *et al.* LPG2 gene duplication in *Leishmania infantum*: a case for CRISPR-Cas9 gene editing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 408. 2020.
- JUNG, T. *et al.* Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly (vinyl alcohol)-graft-poly (lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 352-360. 2001.
- KAISHO, T.; AKIRA S. Toll-like receptor function and signaling. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, p.: 979–987. 2006.
- KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5344-5357. 2007.
- KIM, J. T. *et al.* Absorption study of genistein using solid lipid microparticles and nanoparticles: control of oral bioavailability by particle sizes. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 25, n. 4. 2017.
- KLINMAN, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. **Nature Reviews Immunology**, v.4. 2004.
- KUMAR, R. *et al.* Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.57, n. 3, p. 239-46. 2009.

- LEO, O. *et al.* Vaccine immunology. **Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 25-59. 2011.
- LEVIE, K. *et al.* A 2-dose regimen of a recombinant hepatitis B vaccine with the immune stimulant AS04 compared with the standard 3-dose regimen of Engerix-B in healthy young adults. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, p. 610–614. 2002.
- LIEW, F.Y.; HALE, C.; HOWARD, J.G. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. **Journal of Immunology**, v. 128, p. 1917–1922. 1982.
- LUGER K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251-260. 1997.
- LUO, L. *et al.* Exploring the immunopotential of Chinese yam polysaccharide poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in an ovalbumin vaccine formulation in vivo. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1099 – 1111. 2017.
- LUTSIK, M.E. *et al.* Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. **Pharmaceutical Research**, p. 1480-7. 2002.
- LUTZ, M, B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, p. 77-92. 1999.
- MAALEJ, I.A. *et al.* Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 68, p. 312-320. 2003.
- MALIK, H.S.; HENIKOFF, S. Phylogenomics of the nucleosome. **Nature Structural Biology**, v. 10, p. 882-891. 2003.
- MASINA, S. *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred Vervet monkeys, using a recombinant histone H1 antigen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 8, p. 1250-1257. 2003.
- MCCARRON, P. A. *et al.* Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the micro-encapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 6, p. 365-378. 2008.
- MCKEE, A.S.; MARRACK, P. Old and new adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 47, p. 44-51, 2017.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advances Drug Delivery Review**, v.47, n.2-3, p. 165-196, 2001.
- MEN, Y. *et al.* MHC class I- and class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. **Vaccine**, p. 1047-56. 1999.
- MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers Cell Infection Microbiology**, v.2, n. 121. 2012.
- MOREL, S. *et al.* Adjuvant system AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine**, v. 29, p. 2461–2473. 2011.

- MOSCA, F. *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, n. 105, p. 10501–10506. 2008.
- MULLER, R.; RADTKE, M.; WISSING, S. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmacology**, n. 242, p. 121–8. 2002.
- MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International journal of experimental pathology**, v. 82, n. 5, p. 249-67. 2001.
- O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 727-735. 2003.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. **Hum Vaccin**, v. 5, p. 291–301. 2009.
- OLIVEIRA, F. *et al.* S. Sand flies, *Leishmania* and transcriptome-borne solutions. **Parasitology International**, v. 58, p. 1–5. 2009.
- ORR, M.T. *et al.* Adjuvant formulation structure and composition are critical for the development of an effective vaccine against tuberculosis. **Journal Control Release**, v. 172, p. 190-200. 2013.
- PASSOS, S. *et al.* Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 12, p. 1164-1167. 2005.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1996.
- PETERS, N.C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970–974. 2008.
- PETERS, N.C. *et al.* Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C⁺CD4⁺ effector T cells that are required for protection against re-infection. **PLoS Pathog.**, v. 10. 2014.
- PETRY, V.; GASPARI, A.A. Toll-like receptors and dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 558-70. 2009.
- PLOTKIN, S.A. History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12283-12287. 2014.
- RAPPUOLI, R.; MILLER, H.I.; FALKOW, S. The intangible value of vaccination. **Science**, v. 297, n. 5583, p. 937-939. 2002.
- REED, S.G.; ORR, M.T.; FOX, C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597. 2013.
- REQUENA, J.M. *et al.* Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during *Leishmania* Infections. **Parasitology**, v. 16, n. 6. 2000.
- REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on Leishmania vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.
- RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018. 2018.

- RIBEIRO-GOMES, F.L. *et al.* Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early antileishmania response. **PLoS Pathogenes**, v. 8. 2012.
- RIBEIRO-GOMES, F.L. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4454-62. 2014.
- ROSAS, L.E. e *et al.* Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. Mexicana* infection in mice. **International Immunology**. 2005.
- ROSENTHAL, K. S.; ZIMMERMAN, D. H. Vaccines: all things considered. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 8, p. 821-820. 2006.
- SACKS, D.L. Vaccines against tropical parasitic diseases: a persisting answer to a persisting problem. **Nature Immunology**, v. 15, n. 5, p. 403, 2014.
- SAHDEV, P.; OCHYL, L.J.; MOON, J.J. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 10, p. 2563-2582, 2014.
- SALVADOR, A. *et al.* Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 371-381, 2015.
- SANTI, A.M.M. *et al.* Growth arrested live-attenuated *Leishmania infantum* KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n.1, p. 1-15. 2018.
- SARAIVA, E.M. *et al.* The FML-vaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, 2006.
- SALJOUGHIAN, N. *et al.* Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v.7, n.4. 2013b.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor. 1989. v.1-3.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**. 2016.
- SCOTT, P. *et al.* Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 1, p. 221-227. 1987.
- SCHÖLER, N. *et al.* Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. **International Journal Pharmacology**, v. 231, p. 167–76. 2002.
- SESAB/SUVISA/DIS/SINAN. **Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em:
<<http://www3.saude.ba.gov.br/cgi/deftohtm.exe?tabnet/ripsa/d0204/d0204.def>>. Acesso em: 30 de maio de 2018.
- SEVERINO, P. *et al.* Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 28-34, 2014.

- SHAH, J. A. *et al.* Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 281–291. 2003.
- SHAHBAZI, M. *et al.* Immunological comparison of DNA vaccination using two delivery systems against canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v 212, n. 3, p. 130-139. 2015.
- SHI, S. *et al.* Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167-78. 2019.
- SHIROTA, H.; KLINMAN, D.M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. **Expert Review Vaccines**, v.13, n.2, p. 299–312. 2014.
- SINGH, M. *et al.* Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 811–816. 2000.
- SOTO, M. *et al.* Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 115, p. 342-349. 1999.
- SPÄTH, G.F. *et al.* Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. **Science**, v. 301, n. 5637, p. 1241-1243, 2003.
- STERN, B. V. *et al.* Vaccination with tumor peptide in CpG adjuvant protects via IFN- γ -dependent CD4 cell immunity. **The Journal of Immunology**, v.168, n.12, p. 6099-6105. 2002.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York - Basingstoke: W. H. Freeman and Company, 1995. ISBN 978-0716720096.
- SUN, H.; POLLOCK, K.G.J.; BREWER, J.M. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro. **Vaccine**, v. 21, p. 849–855. 2003.
- TAKEDA, K. *et al.* Toll-like receptors. **Annual Review in Immunology**, v. 21, p. 335-76. 2003.
- UTO, T. *et al.* Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles. **Immunology Letters**, p. 46-52. 2009.
- UTO, T. *et al.* Comparative activity of biodegradable nanoparticles with aluminum adjuvants: antigen uptake by dendritic cells and induction of immune response in mice. **Immunology Letters**, p. 36-43. 2011.
- VAN DOORN, E. *et al.* Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA™ 51 as vaccine adjuvant: A systematic review. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 1, p. 159-169, 2016.
- VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-25. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Immunization, Vaccines and Biologicals**. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/. Acesso em: 25 de Junho de 2018.

XIANG, Q. *et al.* Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. **Burns**, v. 37, n. 5, p. 886-895. 2011.

ZHANG, W.; LYPACZEWSKI, P.; MATLASSHEWSKI, G. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for Leishmania and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms. **MSphere**, v.2, p. 1-15, 2017.

ANEXOS

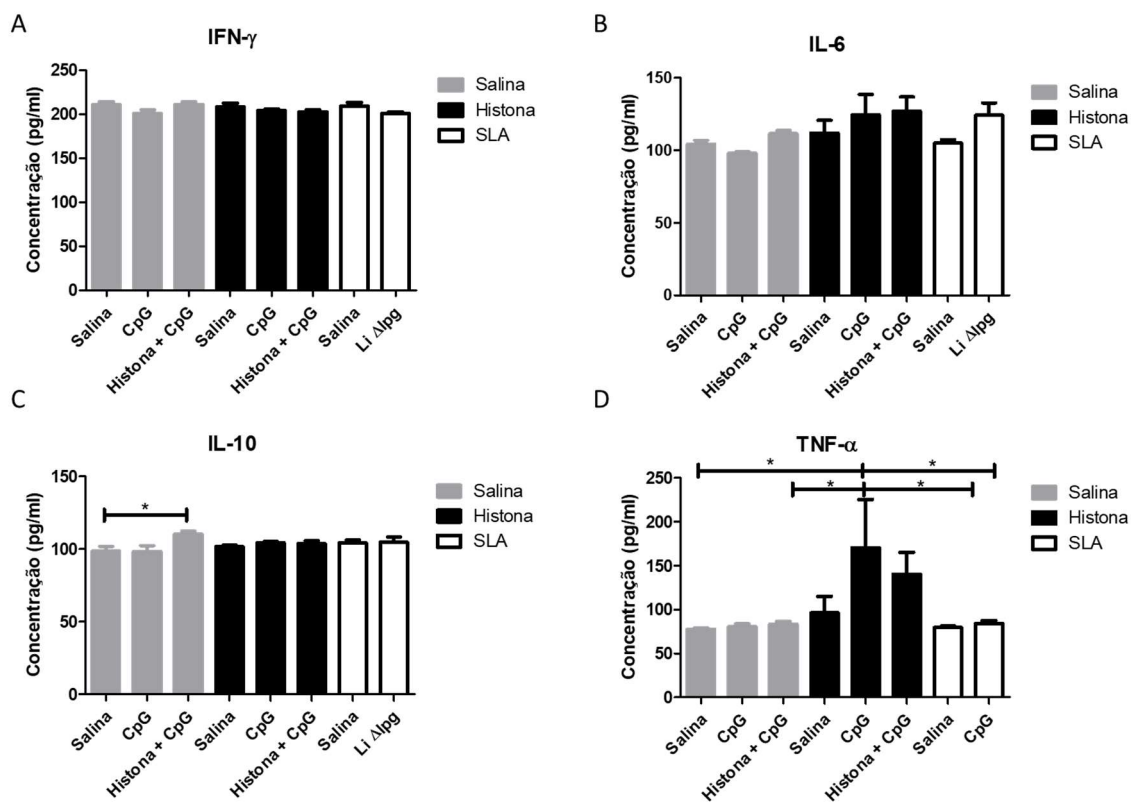
Anexo 1 – NLS positivo. Com ou sem Ovalbumina.

Formulação	Z-average (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
Vazia	257,2	0,45	+ 51,9
OVA	304,9	0,45	+ 48,6

Anexo 2 – NLS negativo. Com ou sem Ovalbumina.

Formulação	Z-average (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
Vazia	261,3	0,29	- 31,9
OVA	160,3	0,16	- 32,9


Anexo 3 – Produção de citocinas de esplenócitos reestimulados com histonas ou SLA. Os dados são expressos pela média \pm SEM, One-way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. $p < 0,05$.



Anexo 4 – Artigo publicado 1 (FARIAS et al., 2019).

Neste trabalho, foi estudado uma classe de proteínas de *S. mansoni*, as VALs (venom allergen-like). A minha participação consistiu em análises *in silico*, na qual foi possível avaliar a presença destas proteínas nos diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasito através da análise de dados já publicados.


International Journal for Parasitology 49 (2019) 593–599



Contents lists available at [ScienceDirect](#)


International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Succinctus

Schistosoma mansoni venom allergen-like proteins: phylogenetic relationships, stage-specific transcription and tissue localization as predictors of immunological cross-reactivity



Leonardo P. Farias^{a,b,1}, Iain W. Chalmers^{c,1}, Samirah Perally^c, Henrique K. Rofatto^a, Colin J. Jackson^c, Martha Brown^c, Mariana I. Khouri^b, Mayra M.F. Barbosa^{a,d}, Paul J. Hensbergen^e, Cornelis H. Hokke^f, Luciana C.C. Leite^a, Karl F. Hoffmann^{c,*}

^aCentro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil
^bInstituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rua Waldemar Falcão, Salvador, Bahia, Brazil
^cInstitute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, SY23 3FG Aberystwyth, UK
^dPrograma de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
^eCenter for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Centre, P.O. Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands
^fDepartment of Parasitology, Leiden University Medical Centre, P.O. Box 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 21 December 2018
 Received in revised form 25 March 2019
 Accepted 28 March 2019
 Available online 25 May 2019

Keywords:
 Venom allergen-like
 Immunological cross reactivity
 Tissue localization
Schistosoma mansoni

ABSTRACT

Schistosoma mansoni venom allergen-like proteins (SmVALs) are part of a diverse protein superfamily partitioned into two groups (group 1 and group 2). Phylogenetic analyses of group 1 SmVALs revealed that members could be segregated into subclades (A–D); these subclades share similar gene expression patterns across the parasite lifecycle and immunological cross-reactivity. Furthermore, whole-mount in situ hybridization demonstrated that the phylogenetically, transcriptionally and immunologically-related SmVAL4, 10, 18 and 19 (subclade C) were all localized to the pre-acetabular glands of immature cercariae. Our results suggest that SmVAL group 1 phylogenetic relationships, stage-specific transcriptional profiles and tissue localization are predictive of immunological cross-reactivity.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anexo 5 – Artigo publicado 2 (QUADROS et al., 2020).

No seguinte trabalho, foi feito o desenvolvimento e avaliação de nanopartículas poliméricas contendo um peptídeo recombinante, adrenomodulina-2, para uso em terapia para angiogêneses. A minha participação foi na etapa de determinação da eficiência de encapsulamento do peptídeo nas nanopartículas através do ensaio de SDS-PAGE.

International Journal of Pharmaceutics 576 (2020) 118997



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Development and *in vitro* characterization of polymeric nanoparticles containing recombinant adrenomedullin-2 intended for therapeutic angiogenesis



Helenita Costa Quadros^a, Laís de Macêdo Ferreira Santos^b, Cássio Santana Meira^a, Mariana Ivo Khouri^a, Bruno Mattei^c, Milena Botelho Pereira Soares^a, William de Castro-Borges^c, Leonardo Paiva Farias^a, Fabio Rocha Formiga^{a,d,*}

^a Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rua Waldemar Falcão, 121, Camêda, 40296-710 Salvador/BA, Brazil
^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 52171-011 Recife/PE, Brazil
^c Laboratório de Farmacologia e Proteômica, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Campus Morro do Cruzeiro, s/n, 35400-000 Ouro Preto/MG, Brazil
^d Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada, Universidade de Pernambuco (UPE), Rua Armênio Marques, 310, Sítio Amaro, 50100-130 Recife/PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Adrenomedullin-2
 PLGA
 Protein delivery
 Nanoparticles

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide. Growth factor therapy has emerged as novel therapeutic strategy under investigation for CVD. In this sense, adrenomedullin-2 (ADM-2) has been recently identified as a new angiogenic factor able to regulate the regional blood flow and cardiovascular function. However, the therapeutic value of ADM-2 is limited by its short biological half-life and low plasma stability. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) micro- and nanoparticles have been investigated as growth factor delivery systems for cardiac repair. In this study, we aimed to develop PLGA nanoparticles containing ADM-2 intended for therapeutic angiogenesis. PLGA nanoparticles containing ADM-2 were prepared by a double emulsion modified method, resulting in 300 nm-sized stable particles with zeta potential around -30 mV. Electron microscopy analysis by SEM and TEM revealed spherical particles with a smooth surface. High encapsulation efficiency was reached (ca.70%), as quantified by ELISA. ADM-2 associated to polymer nanoparticles was also determined by EDX elemental composition analysis, SDS-PAGE and LC-MS/MS for peptide identification. In vitro release assays showed the sustained release of ADM-2 from polymer nanoparticles for 21 days. Cell viability experiments were performed in J774 macrophages and H9c2 cardiomyocyte cells, about which PLGA nanoparticles loaded with ADM-2 did not cause toxicity in the range 0.01–1 mg/ml. Of note, encapsulated ADM-2 significantly induced cell proliferation in EA.hy926 endothelial cells, indicating the ADM-2 bioactivity was preserved after the encapsulation process. Collectively, these results demonstrate the feasibility of using PLGA nanoparticles as delivery systems for the angiogenic peptide ADM-2, which could represent a novel approach for therapeutic angiogenesis in CVD using growth factor therapy.

Anexo 6 – Artigo publicado 3 (LOBO-SILVA et al., 2020).

Neste trabalho, foi avaliado o efeito da droga GSK-J4 sobre parasitos de *S. mansoni*. Participei na avaliação das estruturas de vermes adultos tratados com a droga através de microscopia confocal.

Lobo-Silva et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:140
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-4000-z>

Parasites & Vectors

SHORT REPORT

Open Access



The antischistosomal potential of GSK-J4, an H3K27 demethylase inhibitor: insights from molecular modeling, transcriptomics and *in vitro* assays

Jessica Lobo-Silva^{1†}, Fernanda J. Cabral^{2†}, Murilo S. Amaral³, Patrícia A. Miyasato⁴, Rafaela Paula de Freitas⁴, Adriana S. A. Pereira^{3,5}, Mariana I. Khouri¹, Mayra M. F. Barbosa⁶, Pablo I. P. Ramos⁷, Luciana C. C. Leite⁶, Oluwatoyin A. Asojo⁸, Eliana Nakano⁴, Sergio Verjovski-Almeida^{3,5} and Leonardo P. Farias^{1*}

Abstract

Background: Schistosomiasis chemotherapy is largely based on praziquantel (PZQ). Although PZQ is very safe and tolerable, it does not prevent reinfection and emerging resistance is a primary concern. Recent studies have shown that the targeting of epigenetic machinery in *Schistosoma mansoni* may result in severe alterations in parasite development, leading to death. This new route for drug discovery in schistosomiasis has focused on classes of histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HATs) as epigenetic drug targets. *Schistosoma* histone demethylases also seem to be important in the transition of cercariae into schistosomula, as well as sexual differentiation in adult worms.

Methods: The Target-Pathogen database and molecular docking assays were used to prioritize the druggability of *S. mansoni* histone demethylases. The transcription profile of Smp_034000 was re-analyzed using available databases. The effect of GSK-J4 inhibitor in schistosomula and adult worms' motility/viability/oviposition was assessed by *in vitro* assays. Ultrastructural analysis was performed on adult worms exposed to GSK-J4 by scanning electron microscopy, while internal structures and muscle fiber integrity was investigated by confocal microscopy after Langeron's carmine or phalloidin staining.

Results: The present evaluation of the potential druggability of 14 annotated *S. mansoni* demethylase enzymes identified the *S. mansoni* ortholog of human KDM6A/UTX (Smp_034000) as the most suitable druggable target. *In silico* analysis and molecular modeling indicated the potential for cofactor displacement by the chemical probe GSK-J4. Our re-analysis of transcriptomic data revealed that Smp_034000 expression peaks at 24 h in newly transformed schistosomula and 5-week-old adult worms. Moreover, this gene was highly expressed in the testes of mature male worms compared to the rest of the parasite body. In *in vitro* schistosome cultures, treatment with GSK-J4 produced striking effects on schistosomula mortality and adult worm motility and mortality, as well as egg oviposition, in a dose- and time-dependent manner. Unexpectedly, western blot assays did not demonstrate overall modulation of H3K27me3