

ALICE RAYOL RAMOS SANDES

EFICÁCIA DA VACINA INTRANASAL UTILIZANDO  
ANTÍGENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE  
*LEISHMANIA* E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR NA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EFICÁCIA DA VACINA INTRANASAL UTILIZANDO ANTÍGENOS DE  
DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR  
NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA

Alice Rayol Ramos Sandes

Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas  
(Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Rio de Janeiro

Junho/2006

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Sandes, Alice Rayol Ramos.

Eficácia da vacina intranasal utilizando antígenos de diferentes espécies de *Leishmania* e seu efeito imunomodulador na leishmaniose cutânea murina / Alice Rayol Ramos Sandes – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2006

xii, 86 folhas: il.; 31 cm

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Tese (Mestrado) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2006.

Referências Bibliográficas: f. 62-75

1. Leishmaniose Cutânea
2. *Leishmania amazonensis*
3. Mucosa
4. Vacinação

I. Rossi-Bergmann, B. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. III. Título

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Bartira Rossi Bergamann e desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À LUZ DA MINHA VIDA,  
MINHA AMADA FILHA AGNES

## AGRADECIMENTOS

À Professora Bartira Rossi Bergmann pela oportunidade e orientação.

À minha avó *in memoriam* por ser um espelho para minha vida e por me ensinar que o bem mais precioso que temos é o conhecimento.

À minha mãe pelo carinho e pelo apoio ao longo de toda minha vida.

À minha Tia Tereza e aos meus primos Felipe e Fabio, sem os quais eu não teria ingressado na pós-graduação.

Ao meu amigo Walter por ter me apoiado e me acompanhado ao longo desta longa jornada, e por terem me dado a mão sempre que caí.

À minha amiga Luanda pelas apaixonadas discussões sobre ciência e sobre a vida.

Ao Eduardo Fonseca Pinto pela orientação e pelas discussões que levaram ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Daniel Gomes pelas longas jornadas nos finais de semana e pela amizade.

Aos amigos Suzana, Camila, Roberta, Elaine, Herbert, Caio e Josy pela amizade e pela convivência sempre agradável e por todas as vezes que me deram aquela ajuda especial, com todo o carinho.

Aos camundongos que doaram suas vidas pela ciência

À Deusa mãe por me guiar nestes longos caminhos, e por ser tão onipresente em minha vida e ter me dado o maior presente da minha vida, minha filha Agnes.

## RESUMO

### EFICÁCIA DA VACINA INTRANASAL UTILIZANDO ANTÍGENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA MURINA

Alice Rayol Ramos Sandes

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Resumo da Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

O presente trabalho avaliou a eficácia e a resposta imune induzida por antígenos de várias espécies de *Leishmania* administrados por via intranasal no modelo murino de leishmaniose cutânea. Camundongos BALB/c foram imunizados pela via intranasal com 2 doses (10µg cada, 1 semana de intervalo) dos seguintes antígenos: LaAg, LmAg, LbAg, e LdAg (lisado de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, respectivamente). Após 1 ou 28 semanas após a dose de reforço, os animais foram infectados na pata com promastigotas de *L. amazonensis* GFP. O tamanho das lesões foi monitorado, e ao final dos experimentos foram medidas a carga parasitária na lesão e a produção de citocinas nos linfonodos popliteos e cervicais. O LaAg intranasal induziu proteção significativa e duradoura acompanhada de aumento da produção local de IFN- $\gamma$ . O LdAg intranasal também induziu forte proteção, mas de forma independente do IFN- $\gamma$  e aparentemente relacionada ao TNF- $\alpha$ . Tanto o LmAg como o LbAg intranasal não conferiram proteção, sugerindo especificidade dos antígenos e reação cruzada entre *L. donovani* e *L. amazonensis*. Camundongos C57BL/6 também são protegidos pelo LaAg intranasal, com alta produção de TNF- $\alpha$  indicando que a eficácia da vacina não é restrita à cepa BALB/c. Resultados preliminares sugerem que a eficácia do LaAg intranasal pode depender do sítio de infecção, uma vez que não houve controle da infecção na orelha nas condições testadas.

**ABSTRACT**

EFFICACY OF INTRANASAL VACCINE USING ANTIGENS FROM DIFFERENT LEISHMANIA SPECIES AND ITS IMMUNOMODULATORY EFFECT ON MURINE CUTANEOUS LEISHMANIASIS.

Alice Rayol Ramos Sandes

Orientadora: Bartira Rossi Bergmann

Resumo da Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

In the present work the efficacy and the immune response induced by antigens from different species of *Leishmania* given by the intranasal route was evaluated in a murine model of cutaneous leishmaniasis. BALB/c mice were intranasally immunized with two doses (10 $\mu$ g each, 1 week interval) of the following leishmanial antigens: LaAg, LmAg, LbAg, and LdAg (promastigote lysates of *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* and *L. donovani*, respectively). After 1 or 28 weeks of the burst immunization, the animals were infected in the footpad with promastigotes of *L. amazonensis* GFP. The lesion sizes were monitored during infection, and at the end of the experiments the parasite loads in the lesions and the cytokine production in the popliteal and cervical lymph nodes were measured. Intranasal LaAg induced significant and durable protection against infection that was accompanied by increased production of local IFN- $\gamma$ . Intranasal LdAg also induced strong protection, but in a manner independent of IFN- $\gamma$  and apparently related to TNF- $\alpha$ . Both intranasal LmAg and LbAg were not protective, suggesting antigen specificity and cross-reactivity between *L. donovani* and *L. amazonensis*. C57BL/6 mice were also protected by intranasal LaAg, with increased production of TNF- $\alpha$ , indicating that the vaccine efficacy is not restricted to the BALB/c mouse strain. Preliminary results suggest that the efficacy of intranasal LaAg may depend on the site of infection, as infection in the ear was not controlled under the conditions tested.

**SUMÁRIO**

	Página
Lista de Abreviaturas	x
1- Introdução	1
I- A Leishmaniose	1
II – Quimioterapia	4
III – Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Murina	6
a) Citocinas envolvidas na resposta imune na leishmaniose	8
b) Células efectoras da resposta imune na leishmaniose	12
IV- Leishmaniose Humana	15
V- Vacinação na Leishmaniose	16
VI- Sistema Imune Associado às Mucosas	19
a) Componentes e funções	19
b) Tecido linfoepitelial associado à nasofaringe	22
VII- Vacinação pela Via Intransal	25
2 – Objetivos	30
3- Metodologia	31
4- Resultados	35
5- Discussão	55
6- Conclusões	61
7- Referências Bibliográficas	62

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Ag	Antígeno
BALT	Bronchis-associated Lymphoepithelial Tissue (Tecido linfoepitelial associado aos brônquios)
BCG	Bacille Calmette Guerin
CMIS	Common Mucosal Immune System (Sistema Imune Comum de Mucosa)
Con A	Concanavalina A
CTL	Células T citotóxicas
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DTH	Delayed-Type Hypersensitivity (reação de hipersensibilidade tardia)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAE	Follicle Associated Epithelium (epitélio associado ao folículo)
Fig.	Figura
GALT	Gut Associated Lymphoepithelial Tissue (Tecido linfoepitelial associado à mucosa intestinal)
HEPES	(n-[hydroxyethyl])Piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HEV	High endothelial venule
IEL	Linfócito interepitelial
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
i.n.	Intranasal
LACK	<i>Leishmania</i> homologue of receptors for activated C kinase (Homóloga de <i>Leishmania</i> de Receptores de Proteína Kinase C Ativada)

LaAg	Antígeno de <i>Leishmania amazonensis</i>
LbAg	Antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>
LdAg	Antígeno de <i>Leishmania donovani</i>
LmAg	Antígeno de <i>Leishmania major</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MADCAM1	Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule-1
MALT	Mucosal Associated Lymphoepithelial Tissue (Tecido linfoepitelial associado à mucosa)
NALT	Nasopharyngeal Associated Lymphoepithelial Tissue (Tecido linfoepitelial associado à nasofaringe)
PBS	Phosphate Buffered Saline (salina fosfatada tamponada)
PNAD	peripheral-node addressin (adressina de linfonodo periférico)
PP	Placas de Payer
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$ (Fator de transformação e crescimento -beta)

## 1- Introdução

### I – A Leishmaniose

A leishmaniose constitui uma protozoonose causada por cerca de 21 espécies de protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Em geral, os seres humanos são hospedeiros acidentais desta patologia, enquanto outros mamíferos (tais como roedores e canídeos) são reservatórios na natureza (revisado por Herwaldt, 1999; Murray *et al*, 2006).

A doença é transmitida através da picada da fêmea infectada de cerca de 30 diferentes espécies de insetos, que são os pequenos dípteros muito pilosos de cor palha ou castanho clara, da família *Psycodidae*, cuja subfamília *Phlebotominae* engloba os principais transmissores, onde dois gêneros são de especial relevância: *Lutzomyia* (Américas) e *Phlebotomus* (África, Europa e Ásia). Em seu ciclo biológico natural, aparecem duas formas evolutivas básicas do parasito: uma forma flagelada, infectante, presente no trato digestivo dos insetos transmissores, denominada **promastigota**; e uma forma não móvel, presente no hospedeiro vertebrado, denominada **amastigota** (revisado por Herwaldt, 1999; Gontijo & de-Carvalho, 2003).

As formas promastigotas são regurgitadas pelos insetos flebotomíneos durante sua alimentação, e entram no hospedeiro vertebrado, onde se aderem à superfície de macrófagos teciduais, e são então, fagocitadas. No interior dos macrófagos, mais especificamente no fagolisossomo, os parasitos transformam-se em amastigotas, que se multiplicam até que a célula se rompe. As amastigotas liberadas invadem outros macrófagos residentes, e assim sucessivamente. As amastigotas, quando sugadas pelos insetos vetores durante sua alimentação, transformam-se novamente em promastigotas em seu trato gastrintestinal, completando, desta forma, o ciclo biológico do parasito.

A leishmaniose, na verdade, é um complexo de doenças didaticamente divididas em dois grupos: visceral e tegumentar. A leishmaniose visceral, ou Calazar, é a forma mais grave da doença, sendo causadas por espécies viscerotrópicas do parasito: *Leishmania (Leishmania) donovani* no velho mundo, e *Leishmania (Leishmania) chagasi/ Leishmania (Leishmania) infantum* nas Américas. Neste caso, os parasitos apresentam tropismo pelos órgãos ricos em macrófagos como baço, fígado e medula óssea. O Calazar caracteriza-se por produzir febre irregular e prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, e em fase terminal caquexia e morte, se não houver tratamento.

A leishmaniose tegumentar, por outro lado, manifesta-se por lesões na pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado. Pode ser causada por diversas espécies diferentes de *Leishmania*, assumindo diferentes formas clínicas. Até o presente momento, há 14 espécies reconhecidas de *Leishmania*, dentro dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* que podem produzir a doença na América latina (Silveira *et al*, 2004). No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* que atuam como agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Coutinho *et al.*, 1998).

A forma tegumentar da leishmaniose será estudada de forma pormenorizada a partir deste momento, pois é objeto de estudo da presente dissertação.

A leishmaniose tegumentar pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da resposta imune do hospedeiro e da espécie do parasito (Silveira *et al*, 2004). A forma clínica mais freqüente é a leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por lesões simples, localizadas especialmente nas regiões expostas do corpo, acessíveis ao inseto vetor. Após a inoculação da forma promastigota do parasito pelo inseto vetor, há um período de incubação que pode variar de 10 dias a 3 meses, quando uma pápula eritematosa

inicial que progride lentamente para um nódulo. Com a evolução, na maioria dos casos, formam-se úlceras de contornos regulares, com bordos salientes, e fundo com tecido de granulação grosseira. Acompanha o quadro adenopatia regional, com ou sem linfangite (12-30% dos casos) (Gontijo & Carvalho 2003). A LCL apresenta boa resposta ao tratamento convencional e pode também evoluir para cura espontânea em até 50% dos casos (Grevelink & Lerner, 1996). Todas as espécies de *Leishmania* que causam doença no homem, com exceção das viscerotrópicas, podem causar esta forma clínica da doença. Além da forma localizada, a leishmaniose tegumentar pode se manifestar nas formas mucocutânea (LMC), e na cutânea difusa (LCD). A LMC é causada, na maioria dos casos por *L. braziliensis*, e em alguns casos raros pela *L. amazonensis* (Jesus *et al*, 1987). Esta forma da doença também se inicia com uma úlcera simples, que cura-se espontaneamente, ou após um curto período de tratamento. Após alguns meses ou anos novas lesões podem aparecer na mucosa causando a necrose do tecido mucoso da nasofaringe. A LMC é caracterizada por uma pequena quantidade de parasitos no local e alta resposta imune celular (Silveira *et al*, 1998). A leishmaniose tegumentar difusa constitui a forma anérgica da doença, onde ocorre hiporesponsividade celular por parte do hospedeiro ao parasito, sendo que no Brasil o principal agente etiológico é a *Leishmania (L.) amazonensis* (Lainson, 1993). Tem como características lesões nodulares disseminadas por todo o corpo e ricas em amastigotas, teste de Montenegro negativo, indicando uma baixa ou inexistente resposta imune celular, e, freqüentemente é irresponsiva ao tratamento convencional utilizando antimoniais (Silveira *et al*, 2004).

A leishmaniose é atualmente prevalente em 4 continentes, sendo endêmica em 88 países, 72 dos quais em desenvolvimento, de modo que existem 350 milhões de pessoas em risco, com uma incidência mundial de 12 milhões de casos (World Health Organization,

home page: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/leish-poster.pdf>). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, e 80% dos casos das formas tegumentares ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.

No Brasil, são observadas situações epidemiológicas distintas: uma de doença ligada a florestas, onde ocorre um aumento de incidência devido a desmatamento, envolvendo vetores e reservatórios silvestres, sendo considerada uma doença ocupacional, afetando, em sua maioria, adultos do sexo masculino que trabalham em áreas de risco. Esta situação é predominante na Amazônia. A outra situação é relacionada à transmissão peridomiciliar por espécies de vetores adaptados ao ambiente modificado pelo homem e reservatórios representados por animais domésticos, principalmente cães. Neste caso, a incidência é equivalente nos dois sexos, em todas as faixas etárias, sendo característica da Região Sudeste do país (Gontijo & de Carvalho, 2003).

## II- Quimioterapia

O tratamento de primeira escolha, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é realizado com antimoniais pentavalentes, em doses de 20 mg/kg por via intramuscular ou endovenosa durante 20-30 dias. O uso destes medicamentos parece eficaz na maioria dos casos, contudo é necessária uma terapia muito prolongada, e a resistência do parasito a estes medicamentos tem aumentado (Walton, 1987; Lira *et al*, 1989). Além disso, o tratamento com antimoniais é quase invariavelmente acompanhado por efeitos adversos, que incluem cardiotoxicidade e hepatotoxicidade (Bermann, 1988; Hepburn *et al*, 1994). Entre os antimoniais pentavalentes disponíveis estão o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), mas outras marcas genéricas já encontram-se disponíveis no mercado.

A Anfotericina B e a Pentamidina, anteriormente eram consideradas drogas de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose devido aos seus efeitos tóxicos nas doses terapêuticas (febres, calafrio, e dor nas articulações). Contudo, estas vem sendo atualmente reavaliadas, pois novas formulações e novos esquemas terapêuticos tem sido utilizados. Por exemplo, em 1997 o FDA aprovou uma formulação lipídica de Anfotericina B para o tratamento de leishmaniose visceral. Esta formulação conhecida como Ambisome<sup>®</sup> é formulada na forma de lipossomas para uso endovenoso. Além disso, encontram-se também disponíveis a dispersão coloidal (Amphocil<sup>®</sup>) e o complexo lipídico (Abelcet<sup>®</sup>) de Anfotericina B, mas essas são utilizadas praticamente só para micoses sistêmicas. O Ambisome constitui uma opção de primeira escolha em pacientes que não responderam à terapia com antimoniais ou não toleram a terapia parenteral prolongada com Anfotericina B (Tracy & Webster, Jr, 2003).

O principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos foi a introdução da Miltefosina no arsenal terapêutico. Trata-se de uma fosfocolina que pode ser administrada por via oral (enquanto as demais formulações somente podem ser administradas pela via parenteral), foi desenvolvida inicialmente para o tratamento de câncer, mas não pôde ser introduzida na prática clínica por apresentar efeitos tóxicos nas doses terapêuticas necessárias para combater aquela doença. Por outro lado, a Miltefosina mostrou atividade no tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. donovani*, tendo sido licenciada para uso, em 2002 na Índia, onde ocorre alto grau de resistência aos antimoniais (revisado por Murray *et al*, 2005). Embora a Miltefosina represente um avanço na luta contra a leishmaniose, sendo o primeiro fármaco administrado pela via oral, ela tem efeitos adversos desagradáveis e produz teratogenicidade, que podem limitar a adesão ao tratamento. Estudos clínicos revelaram que 60% dos pacientes relataram sintomas

gastrointestinais como náuseas, vômito e diarreia (Jha *et al*, 1999). Todavia, apesar de ter sido introduzido recentemente na clínica, já foram isoladas cepas de *Leishmania* resistentes ao medicamento (Pérez-Victoria, 2003). Além disso, a Miltefosina não se mostrou promissora para aplicação em *L. (V) braziliensis*, pois se demonstrou menos eficaz que a terapia com antimoniatos pentavalentes (Soto, 2004).

### III) Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Murina

A leishmaniose tegumentar murina é um modelo interessante para a doença humana não somente pela estreita correlação com a doença humana, mas também por ser um modelo para o estudo de diversos aspectos da resposta imune celular. A primeira demonstração direta da relevância do balanço Th1/ Th2 para a regulação do resultado desdobramento de uma patologia *in vivo* originou-se de estudos em modelos murinos de infecção por *L. major* em camundongos BALB/c (Alexander & Kaye, 1985)

A maioria das cepas de camundongos é capaz de controlar a infecção por *L. major*, no entanto algumas cepas, como a cepa de camundongos BALB/c, fracassam e desenvolvem lesões cutâneas progressivas, que podem se desenvolver para doença sistêmica. A predisposição genética para a susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. major* correlaciona-se a dominância de uma resposta Th2 direcionada por IL-4 que causa doença ou uma resposta Th1, direcionada por IL-12 e dominada por IFN- $\gamma$ , que promove cura e *clearance* do parasito (Sacks & Trauth, 2002). A produção de IL-4 no início da infecção por *L. major* leva a um perfil de susceptibilidade caracterizado por uma resposta tipicamente Th2. A produção precoce de IL-4 parece dever-se à uma população de células CD4+ com TCR V $\beta$ 4V $\alpha$ 8, que reconhece o antígeno de LACK (Homóloga de *Leishmania* de Receptores de Proteína Kinase C Ativada) (Launois *et al*, 1997). Evidência adicional para o papel do antígeno LACK na susceptibilidade de camundongos BALB/c foi

observada em camundongos que se tornaram tolerantes ao antígeno LACK por expressão transgênica deste antígeno no timo, e que demonstraram uma resposta do tipo Th2 diminuída, e uma resposta do tipo Th1 aumentada, e, conseqüentemente, um fenótipo de cura (Julia *et al*, 1996). A resposta imune característica de camundongos susceptíveis a infecção por *L.major* caracteriza-se por elevados níveis de IL-4, IL-10, IL-6 e TGF- $\beta$ . O fenótipo de resistência encontra-se associado a uma elevada produção de citocinas do tipo Th1, especialmente o IFN- $\gamma$ , capaz de ativar os mecanismos microbicidas das células hospedeiras, os macrófagos, para matar os parasitos intracelulares (Green *et al*, 1990). A IL-12 parece ser uma citocina importante na resistência ao parasito, pois foi observada a reversão do quadro de susceptibilidade em BALB/c, após a administração de IL-12 recombinante, que foi capaz de curar a infecção por redirecionar a resposta Th2 precoce para uma resposta do tipo Th1 (Heinzel *et al*, 1993). Portanto, no fenótipo de resistência à *L. major*, há necessidade de uma fonte sustentada de IL-12 e a expressão do receptor  $\beta 2$  (IL-12R  $\beta 2$ ) (Himmelrich *et al*, 1998).

Todavia, outras espécies, em particular as espécies do complexo da *L.mexicana*, como a *L.amazonensis* e *L. mexicana* estão associadas com padrões de resposta imune bem distintos daqueles observados para *L.major*. Por exemplo, camundongos C57BL/6 ou C3H, que curam a infecção por *L.major*, desenvolvem lesões crônicas quando infectados tanto com *L.amazonensis* quanto com *L.mexicana* (Alexander & Kaye, 1985). Portanto, há fatores de virulência profundamente diferentes para as espécies do complexo *L.(L)mexicana*, que afetam, conseqüentemente, a patologia associada à doença, bem como os mecanismos imunológicos que medeiam a susceptibilidade/resistência a infecção, conforme será explorado a seguir de forma mais detalhada.

Adicionalmente, em termos de expressão de citocinas, observou-se que há um expansão equilibrada de células Th1 e Th2 ao longo do curso da infecção por *L. amazonensis*, diferente do modelo de *L. major*, em que há uma dominância de uma resposta do tipo Th2 em animais suscetíveis, ou de uma resposta do tipo Th1 em animais resistentes. Já nas primeiras 2 semanas de infecção por *L. amazonensis* há produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , bem como de IL-4, IL-5 IL-6 e IL-10 pelas células dos linfonodos drenantes. Os percentuais de ambas as células T CD4+ produtoras de citocinas Th1 ou Th2 aumentou em 6 semanas, e um perfil similar de expressão foi mantido em 12-18 semanas após a infecção, durante as quais lesões mais robustas se estabeleceram (Ji *et al*, 2002).

Além disso, conforme ressaltado anteriormente, o antígeno solúvel LACK é um importante fator de suscetibilidade em infecções por *L. major*, contudo, já foi demonstrado que este antígeno tem papel desprezível na suscetibilidade de camundongos BALB/c a *L. amazonensis* (Ji *et al*, 2002), assim como a *L. mexicana* (Torrentera *et al*, 2001), e em respostas protetoras contra *L. donovani* (Melby *et al*, 2001).

a) *Citocinas envolvidas na resposta imune na leishmaniose*

Na infecção por *L. amazonensis*, algumas evidências vem demonstrando que o IFN- $\gamma$  parece ter eficácia limitada. Observou-se surpreendentemente que camundongos C57BL/6 *knock out* para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  -/-) não demonstraram uma suscetibilidade aumentada a *L. amazonensis* quando comparados aos animais selvagens (Colmenares *et al*, 2003), em contraste com o que foi observado com *L. major* cuja infecção é exacerbada nesta cepa de camundongos (Wang *et al*, 1994). Foi também constatado que há aumento de replicação de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos de BALB/c estimulados com IFN- $\gamma$  (Qi *et al*, 2004), revelando uma habilidade singular de *L. amazonensis* em resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Evidências indicam que camundongos BALB/c

deficientes de receptor IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R) tiveram a progressão das lesões significativamente mais lenta do que animais do tipo selvagem (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). O agravo da infecção pode ser observado *in vitro* em uma ampla faixa de concentrações de IFN- $\gamma$ , sendo que somente nas concentrações de IFN- $\gamma$  mais elevadas é observada a redução da infecção. Conseqüentemente, níveis supra-ótimos de IFN- $\gamma$  seriam necessários para controlar do parasito, e, estes níveis são mais elevados do que aqueles necessários para controlar a infecção por *L.major* (Suderkotter, 1993).

Qi e colaboradores (2004) sugeriram que *L.amazonensis* possa ter desenvolvido algum mecanismo de escape, ainda desconhecido, contra a ativação macrofágica por IFN- $\gamma$ . Conforme mencionado acima a IL-4 desempenha um papel primordial na infecção por *L.major*. Contudo, seu papel na infecção por *L.amazonensis* parece depender de alguns fatores. Camundongos C57/BL6 IL-4  $-/-$  não apresentaram qualquer exacerbação da lesão em relação aos camundongos selvagens quando infectados na pata; contudo, quando se compara a infecção na base da cauda os camundongos IL-4  $-/-$  apresentam lesões significativamente menores em relação aos animais do tipo selvagem, demonstrando ser a susceptibilidade dependente do sítio de infecção (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). No caso de camundongos BALB/c a susceptibilidade a infecção por *L.amazonensis* parece estar mais relacionada à produção de IL-4, pois camundongos BALB/c IL-4  $-/-$  apresentam lesões comparativamente menores aos camundongos do tipo selvagem. Resultados protetores ainda mais significativos podem ser evidenciados em camundongos knock out para o receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$   $-/-$ ), o que é um indicativo de que IL-13 pode também ter alguma contribuição na progressão da doença (McMahon-Pratt *et al*, 2004). Recentemente foi demonstrado que a susceptibilidade a infecção por *L.amazonensis* em camundongos IL-4  $-/-$  é dependente do inóculo de parasitos, pois em infecções com

inóculos mais altos de promastigotas não pôde ser observada diferença significativa entre as lesões do animal knock out e do animal selvagem (Guimarães *et al*, 2006). Contudo, cabe reforçar que a produção de IL-4 na patogênese da *L. amazonensis* não parece estar relacionada ao antígeno LACK, como mencionado anteriormente.

A IL-10 parece ser um importante fator de susceptibilidade dos camundongos a *L. amazonensis*. A IL-10 é capaz de inibir funções celulares efetoras e acessórias das células que são necessárias para o controle de diversos patógenos intracelulares. Inicialmente, a IL-10 foi identificada como um produto de células Th2, inibindo a proliferação, desenvolvimento e função de células Th1 (Fiorentino *et al*, 1989). Atualmente já se sabe que esta citocina é também sintetizada por uma variedade de outros tipos celulares incluindo macrófagos, queratinócitos, células dendríticas e mastócitos (Moore *et al*, 2001). A IL-10 pode inibir uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , bem como NO em monócitos e macrófagos (Bogdan *et al*, 2001; Gazzinelli *et al*, 1992; Ralph *et al*, 1992). Em humanos, a severidade da leishmaniose visceral foi relacionada a níveis elevados de IL-10 (Ghalib *et al*, 1993). Foi evidenciado que o extrato da saliva do vetor do gênero *Lutzomyia* é capaz de agravar a infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*, e que o referido extrato aumenta, transitoriamente, os níveis de IL-10 no sítio de infecção, demonstrando a importância desta citocina na infecção natural (Norsworthy *et al*, 2004). Camundongos BALB/c deficientes de IL-10 (IL-10  $-/-$ ) podem controlar a infecção por *L. major*, sugerindo que a IL-10 tem um papel crucial na mediação da susceptibilidade e patogênese da leishmaniose tegumentar (Kane & Mosser, 2001). Camundongos BALB/c IL-10  $-/-$  infectados por *L. amazonensis* apresentam uma redução significativa na carga parasitária em relação aos animais selvagens, apesar de não terem apresentado uma redução significativa da lesão quando

comparada aos camundongos selvagens. Os animais IL-10  $-/-$  apresentaram um perfil de citocinas do tipo Th1 mais pronunciado (maior produção de IFN- $\gamma$ ) e uma maior produção de NO em relação aos camundongos selvagens (Padigel *et al*, 2003). Vale ainda mencionar que o tratamento com anticorpo anti-IL-4 em camundongos IL10  $-/-$  infectados com *L.mexicana* levou a uma redução bastante significativa da lesão, indicando que a supressão destas duas citocinas pode ser determinante no controle da lesão (Padigel *et al*, 2003).

O TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) constitui uma citocina relacionada ao reparo de tecidos, mas exerce potentes efeitos regulatórios na função de macrófagos, incluindo a supressão da produção de IL-12 e a ativação de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$ , incluindo a inibição da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), eventos estes críticos para a resolução da infecção causada por *Leishmania*. TGF-  $\beta$  é produzido por macrófagos após a infecção por *L.amazonensis in vitro* (Barral *et al*, 1995). Evidência para o papel de TGF-  $\beta$  na susceptibilidade à infecção por *L. major* vem das observações de que células produtoras de TGF-  $\beta$  são mais proeminentes em lesões de BALB/c em comparação à cepa resistente C57BL/6. O tratamento de camundongos C57BL/6 com TGF-  $\beta$  recombinante promove a doença nestes animais tanto em infecções com *L. amazonensis* quanto *L. braziliensis*. Da mesma forma, o tratamento de camundongos BALB/c com anticorpo anti-TGF-  $\beta$  promove resistência aumentada a *L.amazonensis*, bem como uma resposta imune do tipo Th1 mais pronunciada (Barral *et al*, 1992). Ademais, camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* que foram tratados com TGF-  $\beta$  recombinante apresentaram lesões exacerbadas em relação aos controles, acompanhadas por um aumento nos níveis de IL-10 e redução de IFN- $\gamma$  (Barral *et al*, 1993). O tratamento de camundongos CB6-1, parcialmente suscetíveis à infecção por *L.major*, com anticorpo anti-TGF-  $\beta$  é capaz

de elevar os níveis de NO, bem como reduzir a carga parasitária levando, deste modo, à resolução da infecção por *L. major* (Li *et al*, 1998).

O Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é um potente pró-inflamatório capaz de estimular, *in vitro*, as funções de monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos. O tratamento de camundongos com TNF- $\alpha$  recombinante foi benéfico para o curso da lesão, enquanto o tratamento com anticorpo neutralizante anti-TNF-  $\alpha$  foi prejudicial ao curso da lesão com *L. major* (Titus *et al*, 1989). Camundongos BALB/c imunizados com uma cepa de *L. major* avirulenta apresentam proteção contra a infecção, que é acompanhada por uma aumentada produção do TNF-  $\alpha$ . O tratamento destes camundongos com anti-TNF-  $\alpha$  reverte a proteção promovida pela imunização (Theodos *et al*, 1991). O TNF-  $\alpha$ , mas não IFN- $\gamma$ , é capaz de suprimir os efeitos supressores de TGF-  $\beta$  em macrófagos murinos derivados de medula óssea (Corradin *et al*, 1993). Além disso, em macrófagos humanos, TGF- $\beta$  exógeno é capaz de reverter os efeitos de IFN- $\gamma$  no controle da infecção. Por outro lado, TNF-  $\alpha$  em altas concentrações elimina completamente os efeitos supressores de TGF-  $\beta$  (Barral *et al*, 1995). Em outro estudo, foi verificado que o *clearance* de neutrófilos apoptóticos por macrófagos de camundongos BALB/c leva à produção de TGF-  $\beta$  por estas células, gerando uma exacerbada replicação de *L. major*, *in vitro*. Por outro lado, macrófagos de camundongos C57BL/6 que fagocitaram os referidos neutrófilos apoptóticos produziram TNF- $\alpha$ , e, levaram a uma destruição de *L. major* dependente desta citocina (Ribeiro-Gomes *et al*, 2004).

#### *b) Células efetoras da resposta imune na Leishmaniose*

Células T CD4<sup>+</sup> são importantes na resistência às infecções causadas por *L. major* e por *L. donovani*, pois em camundongos *nude* observa-se multiplicação e disseminação do parasito e, exacerbção da doença. Contudo, surpreendentemente, foi observado que

camundongos C57BL/6 deficientes de célula T (*nude*, (RAG)-2<sup>-/-</sup>, ou MHC de classe II<sup>-/-</sup>) infectados com *L.amazonensis* apresentam lesões negligenciáveis e cargas parasitárias muito reduzidas no sítio cutâneo, durante um período tão longo quanto 5 meses após a infecção (Soong *et al*, 1997). Além disso, quando camundongos deficientes em RAG-2 foram reconstituídos com células T CD4<sup>+</sup> o desenvolvimento de lesão progressiva foi restabelecido (Soong *et al*, 1997). Contudo, diversos estudos apontam serem as células T CD4<sup>+</sup> importantes na proteção vacinal contra *L. amazonensis* (Colmenares *et al*, 2003; Kar *et al*, 2004).

Células T regulatórias (Treg) constituem uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> importantes como reguladoras negativas da resposta imune. O fenótipo predominante destas células inclui células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, embora também possam haver células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> apresentando estas funções. Em termos moleculares, esta população pode ser distinguida pela expressão do fator de transcrição Foxp3. Embora tenham sido primeiramente identificadas por sua habilidade de prevenir doenças auto-imunes, atualmente, é claro que as células Treg tem um papel mais geral na regulação da imunidade, prevenindo respostas imunes patológicas. A capacidade das células Treg em inibir uma ampla gama de variadas resposta imunes sugere que elas funcionam através de diversos mecanismos diferentes (revisado por Thompson, C, 2004). A supressão de respostas de célula T *in vivo* parece ser dependente de citocinas imunossupressoras, já tendo sido descritos os papéis de TGF- $\beta$  (tanto secretado quanto de membrana) e IL-10 (revisado por Bluestone & Tang, 2004). Diversas observações têm demonstrado que a imunidade funcional a diversos patógenos é influenciada por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (revisado por Rouse & Suvas, 2004), já tendo sido demonstrado seu papel na leishmaniose. Células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> podem controlar a persistência do parasito por tempo

prolongado associado à resistência à re-infecção por *L.major* (Belkaid *et al*, 2002). No modelo de *L.amazonensis*, as células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> parecem ser importantes na contenção inicial da infecção (Ji *et al*, 2005), e, a ausência das mesmas leva a exacerbação das lesões.

Um importante papel das células T CD8<sup>+</sup> na leishmaniose tegumentar, já foi sugerido em vários trabalhos. Foi demonstrado por Titus e colaboradores em 1987, que a depleção de células T CD8<sup>+</sup> durante o curso da lesão leva à exacerbação da doença tanto em camundongos suscetíveis quanto em camundongos resistentes. Em animais relativamente resistentes, C57BL/6 infectados com *L.amazonensis*, a depleção de células CD8<sup>+</sup> reduziu os níveis de IFN- $\gamma$  em 77%. (Chan, 1993). As células CD8<sup>+</sup> são também importantes produtoras de TNF- $\alpha$ . Também foi demonstrada a importância das células T CD8<sup>+</sup> na indução de respostas protetoras em animais imunizados com antígeno P-8 de membrana de amastigota contra infecção por *L. amazonensis*. Neste trabalho foi demonstrado que a proteção parece ser por um mecanismo independente de MHC-II, já que animais selvagens imunizados controlam a lesão e tem uma carga parasitária mais baixa, enquanto  $\beta_2M^{-/-}$  imunizados não apresentam redução de lesão nem de carga parasitária em relação aos animais do grupo controle. Adicionalmente, também é evidenciado que células CD8<sup>+</sup> expressando perforina são necessárias na promoção da proteção após a vacinação com o antígeno de amastigota associado à membrana, P-8 de *L. pifanoi* (Colmenares *et al*, 2003).

Portanto, observa-se que uma resposta imune polarizada para Th1 tem um papel paradoxal na infecção por *L.amazonensis*. É um consenso que citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que são citocinas do tipo Th1, são críticas para ativação de macrófagos (e destruição dos parasitas), e sua produção correlaciona-se ao controle da doença humana.

Contudo, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  podem gerar uma resposta inflamatória associada ao recrutamento e retenção celular, incluindo monócitos/macrófagos, que são necessárias para a sobrevivência e persistência dos parasitos. O que é crítico, na realidade, é que *L.amazonensis* parece ser excessivamente resistente aos mecanismos de morte impostos pelos macrófagos. Além disso, foi apontado recentemente um importante papel da imunidade supressora na contenção da progressão da lesão na infecção por *L.amazonensis*, sugerindo ser necessário, na realidade um equilíbrio entre imunidade e tolerância para contenção da infecção (Tabara *et al.*, 2005).

#### IV) Leishmaniose Humana

No homem a dicotomia das células CD4<sup>+</sup> em células Th1 e Th2 não está completamente estabelecida. Entretanto existem evidências de que células T CD4<sup>+</sup> humanas têm padrão de citocinas e funções que são comparáveis às células Th1 e Th2 de camundongos (Kharazmi *et al.*, 1999), inclusive em resposta a antígenos de *L. major* e *L. donovani* (Kemp *et al.*, 1998; Kurtzhals *et al.*, 1994). Como nos camundongos, em humanos o espectro de citocinas típicas de células Th1 é geralmente induzido em resposta a uma série de patógenos intracelulares (Yamamura *et al.*, 1991), enquanto que as citocinas de células Th2 são induzidas em resposta às doenças alérgicas e às infecções por helmintos (Limaye *et al.*, 1990; Maggi *et al.*, 1992).

Estudos têm demonstrado um importante papel para as células T CD8<sup>+</sup> na leishmaniose humana, visto estar esta população presente em níveis mais elevados em todas as formas da doença (com exceção da forma mucocutânea), incluindo infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Coutinho e colaboradores (1998) confirmaram que as células T CD8<sup>+</sup> parecem estar relacionadas ao processo de cura da doença.

### V) Vacinação na Leishmaniose

Até o presente momento, não há vacina contra a leishmaniose humana em uso de rotina no mundo. Por outro lado, conforme já comentado, a quimioterapia apresenta diversos problemas. O controle dos insetos vetores pelo uso de inseticidas, mesmo sendo eficaz no domicílio e peri-domicílio não é eficaz em áreas silvestres, devido aos hábitos de vida e reprodução dos insetos vetores; além disso, é inviável em larga escala por questões ecológicas e econômicas (Young & Arias, 1991). O controle do hospedeiro reservatório é difícil, pois alguns deles são silvestres. A eliminação de cães infectados também não teve o efeito esperado (Courtenay *et al*, 2002)

Pelos motivos acima, há necessidade do desenvolvimento de uma vacina preventiva eficaz contra leishmaniose, e, este objetivo vem sendo perseguido há várias décadas, sem, contudo ter gerado uma vacina que tenha ultrapassado o estágio de fase 3 de testes clínicos.

Historicamente, a leishmaniose cutânea, tem sido o foco de diversas tentativas de vacinação, provavelmente devido ao fato de ser conhecida desde a antiguidade (leishmanioses cutâneas do velho mundo), quando indivíduos que curavam suas lesões na pele ficavam protegidos de uma re-infecção. Beduínos e algumas sociedades tribais do Curdistão tradicionalmente expunham seus bebês a picadas de insetos a fim de protegê-los de lesões faciais. Outra técnica ancestral praticada no Oriente Médio envolvia o uso de um espinho para transferir material infeccioso de lesões para indivíduos não infectados. Com o estabelecimento por Nicole e Maneau em 1908 de condições de cultura para o crescimento de promastigotas, organismos vivos passaram a ser utilizados para vacinação (infecções controladas). O sucesso desta estratégia dependia da viabilidade e infectividade dos organismos injetados. Organismos que perderam sua virulência foram capazes de

induzir hipersensibilidade do tipo tardia (DTH- *Delayed Type Hypersensitivity*), mas não foram capazes de proteger de infecção natural subsequente (Kellina, 1965). Entretanto, o uso de vacinas vivas tem diversos problemas, incluindo o desenvolvimento de grandes lesões na pele, exacerbação de psoríase e outras doenças de pele, e mesmo imunossupressão. Conseqüentemente, o uso de organismos virulentos para vacinação foi descontinuado. Existem, atualmente, em estudo vacinas de primeira geração (parasitos mortos), segunda geração (antígenos purificados) e de terceira geração (vacinas gênicas contendo genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes) (revisado por Handman, 2001; Scott *et al*, 2004; Rhea, *et al*, 2005). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações testadas contra leishmaniose cutânea.

As vacinas de segunda e terceira gerações somente foram testadas em modelos animais, não tendo ainda sido aplicadas em seres humanos. Estas vacinas apresentam alguns problemas relacionados a uma resposta imune que não apresentam as características de durabilidade e potência desejáveis a uma vacina, e também requerem a utilização de adjuvantes (Tabbara *et al*, 2005). Uma vacina contendo gp-63 recombinante associada à BCG somente foi capaz de conferir proteção parcial contra *L. major* em macacos vervet (Olobo *et al*, 1995).

O conceito de vacinas “mortas” de *Leishmania* foi por muitas décadas negligenciado possivelmente devido a resultados conflitantes obtidos na década de 40 quando vacinas contendo parasitos mortos falharam em promover proteção no Oriente Médio. Uma vacina bastante estudada no Brasil, em seres humanos é a Leishvacin<sup>®</sup>, uma vacina polivalente contendo lisado total de promastigotas de várias espécies (*L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. guyananensis*). Esta vacina foi produzida em larga escala, mas sua produção foi descontinuada em 1991, aparentemente, por desinteresse do

fabricante (Biobras). Ademais, uma formulação de vacina contendo lisado total de *L.amazonensis* autoclavado ou não autoclavado, administrado parenteralmente, à voluntários sadios, com teste de Montenegro negativo. A conversão do teste de Montenegro foi de 59% e 83%, respectivamente, tendo sido a resposta de células T CD8+ mais pronunciada do que de células T CD4+ no sangue periférico destes indivíduos (De Luca *et al*, 1999).

TABELA 1 – Exemplificações de Vacinas Experimentais contra Leishmaniose cutânea

<b>Antígeno</b>	<b>Modelo de Imunização</b>	<b>Proteção</b>	<b>Hospedeiro</b>
Promastigotas Vivas	Profilática (Rússia, Israel)	Depende da Virulência	Humanos
Promastigotas Mortas	Profilática (Oriente Médio, Brasil)	Variável	Humanos
Promastigotas Mortas com BCG	Terapêutica (Brasil)	Alta taxa de cura	Humanos
Promastigotas Mortas com BCG	Profilática (Irã)	Sem Proteção, estímulo transiente	
Promastigotas Mortas com IL-12	Profilática	Boa	Primatas, camundongos, cães
Promastigotas irradiadas	Profilática	Boa	Camundongos
Promastigotas vivas atenuadas	Profilática	Boa	Camundongos
Gp63 Recombinante ou Nativa e Peptídeos Sintéticos	Profilática	Boa	Camundongos, primatas
Gp46/M2/PSA-2 Nativos ou Recombinantes	Profilática	Excelente, mas depende da conformação e do adjuvante	Camundongos
A2, P4 e P8	Profilática	Boa	Camundongos
LACK Recombinante	Profilática	Boa, melhorada por IL-12	Camundongos
Antígeno Flagelar LCR1	Profilática	Boa	Camundongos
DNA “naked” de gp63, PSA-2 e LACK	Profilática ou Terapêutica	Boa	Camundongos

As vantagens da utilização de vacinas de primeira geração seriam a já comprovada segurança e imunogenicidade da preparação, observada em estudos clínicos de

Fase I e II em humanos (Marzochi *et al*, 1998; De Luca *et al*, 2001), apesar de sua eficácia não ter sido confirmada. Além disso, as vacinas de primeira geração geralmente dispensam o uso de adjuvantes tendo em vista a presença de componentes capazes de estimular a resposta imune protetora. O antígeno total de promastigota de *L.amazonensis* demonstrou eficácia em proteger camundongos BALB/c e C57BL/6 contra infecção por *L.amazonensis* quando administrado pela via oral (Pinto *et al*, 2003). Deste modo, a nova abordagem de administração de vacinas mortas de *L.amazonensis* pelas vias de mucosa parece constituir um importante avanço no que tange a imunoproteção profilática contra a leishmaniose tegumentar.

#### VI) Sistema Imune Associado às Mucosas

##### a) *Componentes e funções*

O sistema imune de mucosas é responsável tanto pela mediação da relação simbiótica entre o hospedeiro e os microorganismos endógenos (como por exemplo, bactérias comensais) quanto funciona como primeira linha de defesa física e imunológica do organismo contra patógenos invasores. Através da imunidade inata e adquirida o sistema imune de mucosas mantém a homeostasia imunológica ao longo de uma vasta área de superfície epitelial, que varia das cavidades oral e respiratória até os tratos gastrintestinal e genito-urinário. A grande variedade de antígenos ambientais aos quais somos expostos diariamente através das mucosas – como a microbiota autóctone, microorganismos potencialmente patogênicos, alérgenos, antígenos alimentares - resultou em uma distribuição estratégica de células especializadas na captação, processamento, apresentação de antígenos, produção de anticorpos e defesa mediada por células nas mucosas e glândulas secretoras associadas.

Os mecanismos imunológicos inatos e adaptativos presentes nas mucosas são de fundamental importância para a proteção e sobrevivência do animal, tendo em vista que a grande maioria das doenças infecciosas mundiais atinge as, ou são adquiridas através das superfícies das mucosas gastrintestinal, respiratória ou genito-urinária. Os mamíferos desenvolveram tecidos linfóides secundários organizados tanto no trato respiratório superior como no trato gastrintestinal, especializados na captação, processamento e apresentação de antígenos para indução de respostas imunológicas nas mucosas. Coletivamente, estes tecidos são denominados tecidos linfóides associados à mucosa MALTs (*mucosal-associated lymphoid tissue*), sendo estes considerados sítios de indução, que tem localização anatômica definida conforme a seguir. Na mucosa gastrintestinal encontram-se os tecidos linfoepiteliais associados ao intestino- GALT (*gut-associated lymphoepithelial tissues*), tais como as Placas de Payer (PP), o apêndice e um grande número de células linfóides espalhadas pela lâmina própria e epitélio intestinal. Associado às vias aéreas encontra-se o tecido linfoepitelial associado aos brônquios – BALT (*bronchis-associated lymphoepithelial tissue*) (Mestecky *et al*, 2003). A organização deste último difere consideravelmente entre as espécies, contudo, em homens e camundongos este tecido é negligenciável (Pabst, 1992), a não ser em casos de inflamação crônica (Sato *et al*, 1996). Os mais importantes sítios para indução de respostas imunes contra antígenos inalados/intranaisais em humanos, primatas e ratos parecem ser os tecidos linfoepiteliais associados à nasofaringe (NALTs - *nasopharyngeal-associated lymphoepithelial tissue*). Em humanos o conjunto destes tecidos recebe a denominação de Anel de Waldeyer, e inclui as tonsilas palatinas e adenóides, sendo este muito similar em camundongos (Kiyono & Fukuyama, 2004). Deste modo, o NALT e GALT em seres humanos e camundongos, e possivelmente primatas; e o GALT e BALT em outros sistemas experimentais,

compreendem o Sistema Imune Comum de Mucosa (CMIS – *Common Mucosal Immune System*), que constitui uma via integrada que permite a comunicação entre os tecidos linfóides organizados associados à mucosa (sítios de indução: Placas de Payer e NALT) e os demais tecidos de mucosa difusos (sítios efetores), tornando possível a indução e a regulação da imunidade protetora contra microorganismos patogênicos.

Os MALTs contêm todas as células imunocompetentes necessárias para a geração de uma resposta imune, ou seja, células B, células T e células apresentadoras de antígeno. Também associado ao MALT existem células extremamente especializadas que funcionam como um portal entre a luz da mucosa e os MALTs. Estas células são denominadas células M (*Microfold cells*). As células M estão localizadas no epitélio associado ao folículo dos MALTs organizados, e são responsáveis pela captação e transporte de antígenos diretamente para os tecidos linfóides subepiteliais. Estas células encontram-se intimamente associadas às células linfóides. Cabe ressaltar a importância destas células na resposta imune das mucosas, pois os MALTs não possuem um suprimento linfático de antígenos, sendo que os antígenos originam-se diretamente de materiais presentes nas superfícies epiteliais (Davis, 2001).

Os MALTs contêm regiões organizadas que incluem uma área subepitelial (domo), zonas de célula B com centros germinativos contendo células B produtoras de IgA de superfície, e regiões de células T adjacentes a regiões com células apresentadoras de antígeno (APCs) e vênulas endoteliais altas (HEVs – *High endothelial venules*). Linfócitos T e B naïve e recirculantes entram no MALT através da HEVs. As populações de células T e B ativadas e de memória emigram dos sítios de indução através da drenagem linfática, circulam através da circulação sanguínea, e dirigem-se para os sítios efetores de mucosa. Estes sítios efetores incluem tecidos mais difusos onde se localizam os linfócitos T e B

antígeno-específicos em última instância e realizam suas respectivas funções; isto é, respostas imunes mediadas por células, respostas imunes citotóxicas, funções regulatórias ou síntese de anticorpos para proteção local e sistêmica (Mestecky *et al*, 2003).

Será objeto de estudo mais pormenorizado no presente trabalho o tecido linfoepitelial associado à nasofaringe (NALT), conforme exposto a seguir.

*b) Tecido Linfoepitelial Associado à Nasofaringe (NALT)*

Embora haja similaridades funcionais entre o NALT e as Placas de Payer presentes no GALT, em termos de seus papéis como sítios de indução, suas organogêneses linfóides são distintas. A formação do NALT não é observada durante a embriogênese ou em camundongos recém-nascidos, embora as PP já estejam presentes no embrião. A expressão da molécula de adesão MADCAM1 (*mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1*) presente nas HEVs das PP já é observada na fase embrionária (Csencsits *et al*, 1999), de modo que ao nascer o camundongo já apresenta as PP organizadas. Por outro lado, a PNAD (*peripheral-node addressin*), expressa pelas HEVs do NALT somente é observada no tecido nasal 1 semana após o nascimento. Contudo, é somente 5-8 semanas após o nascimento que a formação completa da estrutura em forma de sino do NALT é observada (Fukuyama, 2002). As HEVs no NALT expressam um único perfil de adressinas. Todas as HEV do NALT expressam PNAD associado ou não a MADCAM-1, o que difere das PP, centros indutivos do GALT.

O NALT compreende: epitélio associado ao folículo (FAE – *follicle-associated epithelium*), HEVs, áreas enriquecidas com células T e B, células M, células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas e macrófagos. O NALT pode estar envolvido tanto em repostas sistêmicas quanto de mucosa, além de poder gerar sinais

regulatórios positivos ou negativos para indução de imunidade ou tolerância antígeno-específicas, respectivamente.

O NALT parece apresentar folículos linfóides mais desenvolvidos do que o GALT e o BALT, com infiltração intraepitelial marcante por linfócitos. As áreas foliculares são organizadas em áreas de células B e intrafoliculares (áreas de células T) de tamanho similar. O NALT de roedores apresenta abundância de células dendríticas. Os folículos linfóides são recobertos por epitélio ciliado contendo numerosas células M. As células M do NALT parecem ser idênticas às das placas de Payer e do BALT, estando envolvidas em funções imunológicas similares incluindo a captação de antígenos e subsequente resposta imune de mucosa antígeno-específicas. (Ogra, 2003).

A caracterização do mRNA que codifica para citocinas Th1 ou Th2 em células CD4<sup>+</sup> isoladas do NALT de camundongos revelaram um perfil predominante de células Th0, indicando que estas células são capazes de se tornarem Th1 ou Th2 imediatamente após a exposição ao antígeno no trato nasal (Hiroi, 1998), dependendo da identidade do antígeno. Por exemplo, o estímulo por certos patógenos tais como bactérias intracelulares leva a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> Th1, produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNFs. Estas células freqüentemente se desenvolvem após a produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos ativados. Por outro lado, antígenos exógenos nos ambientes de mucosa podem deflagrar o início de uma resposta Th2 por induzirem células T NK1.1 e outras células precursoras a produzirem IL-4.

Nos tecidos de mucosa há também células T citotóxicas (CTL) que constituem importantes células efetoras nestes sítios, além de serem cruciais para a manutenção de memória imunológica na mucosa. No caso das infecções virais, a maior parte das CTLs são CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, sendo o reconhecimento do antígeno via MHC I,

presentes nas células infectadas. Sendo assim, um grande número de CTLs reside no epitélio da mucosa como uma subpopulação de linfócitos interepiteliais (IELs) que residem entre as superfícies basolaterais das células epiteliais. Estas células são classificadas como linfócitos T por apresentarem a molécula CD3 em associação com duas formas de TCR:  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ . É sabido que em camundongos cerca de 80% dos IELs pertencem ao subtipo CD8+ (Mestecky *et al*, 2003).

As células B também estão presentes em número proporcionalmente maior do que das células T nas mucosas, existindo cerca de duas a três vezes mais plasmócitos nas mucosas do que no baço, medula óssea ou linfonodos. Ao contrário das células B sistêmicas que são predominantemente produtoras de IgG, na mucosa, há uma predominância de células produtoras de IgA. De modo geral, as imunoglobulinas produzidas no sítio de mucosa são sintetizadas no local, e transportadas pelas secreções externas (revisado por Bouvet & Fischetti, 1999).

Estudos experimentais em animais evidenciaram que as principais células apresentadoras de antígeno residentes na mucosa das vias respiratórias são uma rede intraepitelial de células dendríticas, comparável à rede de células de Langerhans intraepiteliais na epiderme, mas funcionalmente diferente das células dendríticas sistêmicas, particularmente, as células dendríticas plasmocitóides. As células dendríticas têm um papel fundamental no controle da resposta imune do sistema de células T, sendo responsáveis pela transferência de informação da periferia para os linfonodos regionais (diferentes dos macrófagos que exercem sua função *in situ*) (Jahnsen *et al* 2002). As células dendríticas na mucosa têm sido implicadas na alergia e na indução de tolerância sistêmica (Jahnsen, 2000).

As células T regulatórias são linfócitos T que podem regular respostas imunes. Estas células suprimem a ativação de outras células T CD4+ e CD8+ de memória e naïve, principalmente, através da secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Na mucosa, as células T regulatórias parecem controlar a imunidade da mucosa, tolerância e inflamação em um grau mais elevado se comparado com o controle no compartimento periférico (Mestecky *et al*, 2003). A tolerância nasal pode estar relacionada às células T regulatórias CD4+ CD25-, que parecem ser ativadas por TGF- $\beta$  e não por IL-10 (Unger *et al*, 2002).

#### VII) Vacinação pela Via Intranasal

O NALT apresenta todos os tipos celulares imunes requeridos para a indução de uma resposta imune antígeno específica. A via de imunização intranasal pode induzir tanto uma resposta imune humoral quanto celular. Por este motivo, esta via tem se mostrado promissora para o desenvolvimento de vacinas contra diversas enfermidades.

O interesse em controlar a doença respiratória através de imunização intranasal remonta 1929, quando McKee imunizou coelhos com pneumococos mortos. Foi observado que tal imunização, 11 dias antes do desafio promoveu 100% de proteção contra a doença fatal (revisado por Ogra, 2003).

A administração de antígenos usando a superfície mucosa pode levar a diferentes resultados. O balanço entre a imunidade ativa e a tolerância dependerá da natureza do antígeno e de sua interação com o sítio indutor de mucosa. Fatores como dose, uso de adjuvante, frequência de administração e *background* genético são fatores importantes quando se considera uma via de mucosa para administração de vacinas.

Há diversos fatores que tornam a via intranasal atraente como via de imunização (revisado por Davis, 2001):

- Fácil acesso;

- Alta vascularização;
- Presença de numerosas microvilosidades recobrando o epitélio nasal, gerando uma grande superfície de absorção;
- Após a imunização intranasal, tanto respostas imunes sistêmicas quanto locais podem ser induzidas;
- A imunização nasal não requer agulhas e seringas, que são potenciais fontes de infecção, e, por não ser invasiva facilita a colaboração do paciente;
- Facilidade de imunização de grandes grupos populacionais;
- Ausência da degradação pelo suco gástrico e entérico, possibilitando uma dosagem menor e mais exata do antígeno em comparação com a via oral.

A resposta imune a antígenos protéicos administrados através das vias de mucosa pode manifestar-se como: (1) resposta imune de mucosa, freqüentemente associada à secreção do anticorpo sIgA; (2) *priming* da resposta imune sistêmica, com o desenvolvimento de IgG, IgM séricas e imunidade celular específica; (3) desenvolvimento de tolerância de mucosa com hiporresponsividade imunológica sistêmica, com ou sem modificações no padrão de secreção de IgA nas superfícies mucosas (revisado por Ogra, 2001).

Atualmente é bem aceito que as células dendríticas são importantes atores na indução de respostas imunes pela via de mucosa. As células dendríticas influenciam a geração de anticorpos, produção de citocinas que intensificam a resposta imune e controlam as respostas imunes de mucosa. Contudo, quando imaturas, as células dendríticas induzem um quadro de tolerância antígeno-específica.(Barone *et al*, 1998).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tolerância de mucosa incluem a inativação direta de linfócitos sensibilizados pelo antígeno via deleção clonal e anergia, e interação entre células T efetoras e regulatórias. Pelo fato de ser uma via de imunização capaz de induzir tolerância, esta vem sendo extensivamente investigada para o desenvolvimento de vacinas contra doenças autoimunes bem como na indução de tolerância a alérgenos (Hufnagl *et al*, 2005).

Por outro lado, também há diversos estudos e informação considerável disponível que sugerem uma relação direta entre as diferentes citocinas e o desenvolvimento de tolerância de mucosa. Os fatores que favorecem Th1 são IFN- $\alpha$ , IL-2, e toxina colérica intacta, e impedem o desenvolvimento da resposta tolerância. Enquanto os fatores que favorecem uma resposta Th2 são IL-4, IL-10, e a tolerância é influenciada por TGF- $\beta$  (resposta Th3) (Ogra, 2003). Sendo assim, é possível a indução de respostas imunes sistêmicas após a imunização com antígenos de mucosa, contanto que haja um ambiente favorável para tal.

Em relação às respostas imunes ativas, um dos fatores que predis põem ao seu desenvolvimento é o tempo de exposição ao antígeno no sítio de mucosa. O tempo de exposição das células M ao antígeno é um fator preponderante no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. O que ocorre na imunização pela via intranasal seria a rápida degradação do antígeno, tanto pela ação de enzimas de mucosa como pelas bactérias que fazem parte da microbiota autóctone, impedindo o contato ótimo dos agentes imunizantes e as células M, levando algumas vezes à tolerância (revisado por Ogra *et al*, 2001). Portanto, uma preparação de vacina que vise à administração pela via intranasal deve levar este fato em consideração.

Além disso, há um consenso de que a natureza física do antígeno é também um fator determinante do tipo de processamento pelo qual o antígeno irá passar. Em geral antígenos particulados, ao contrário dos antígenos solúveis, quando em contato com as mucosas, são captados pelas células M, e são então processados e apresentados para células T (revisado por Davis, 2001).

A fim de solucionar estes obstáculos vêm sendo traçadas, atualmente, algumas estratégias visando induzir ou intensificar as respostas imunes sistêmicas à antígenos administrados pela mucosa nasal. Dentre as estratégias podemos citar a introdução de adjuvantes apropriados, a utilização de partículas poliméricas e vacinas de DNA. Foi evidenciado, por exemplo, que o encapsulamento de antígenos de *Schistosoma mansoni* em micropartículas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) foram mais eficazes do que o antígeno livre após uma única imunização intranasal (Baras *et al*, 1999).

Pouco é sabido sobre a indução e manutenção de memória de células T em tecidos de mucosa, contudo, aparentemente, esta parece estar relacionada às células T citotóxicas (CTLs). Foi observado que camundongos vacinados intranasalmente contra vírus herpes simplex (HSV) tiveram um declínio no número CTLs no baço, e paradoxalmente, foram protegidos contra o patógeno em questão (Gallichan *et al*, 1996). Sugeriu-se, neste trabalho, que a falta de CTLs no baço estaria indicando o recrutamento, retenção e recirculação de células CTLs específicas para o sistema comum de mucosa, após a imunização intranasal. Tal fato foi demonstrado posteriormente, quando se verificou que a imunização intranasal proporcionou uma memória de CTL duradoura no sítio de mucosa, quando de um desafio (Gallichan *et al*, 1998). Deste modo, podemos atestar a importância das CTLs na manutenção de memória imunológica no sítio de mucosa. De modo geral, as CTLs

residentes na mucosa, estão presentes em grande número como uma subpopulação de linfócitos interepiteliais.

Portanto, a via de mucosa nasal tem um enorme potencial a ser explorado como uma importante via para administração de vacinas pelas diversas vantagens apontadas acima. Podem ser induzidas tanto respostas imunes locais, quanto sistêmicas, bem como a indução de tolerância a auto-antígenos e alérgenos, dependendo dos fatores como dose, frequência e forma de apresentação do antígeno à mucosa.

No nosso modelo, a administração pela via intranasal com LaAg demonstrou-se eficaz na indução de proteção contra *L.amazonensis* em camundongos BALB/c, conforme será demonstrado no presente trabalho, em detrimento do que foi observado pela administração pela via intramuscular de LaAg, que provocou uma aumento de susceptibilidade a esta infecção (Pinheiro *et al*, 2005). Deste modo, mais estudos são necessários a fim de explorar todas as potencialidades desta via de imunização.

## **2 – Objetivos**

### **2.1) Objetivo Geral:**

O objetivo do presente trabalho é avaliar se a eficácia da vacina contra a leishmaniose cutânea usando promastigotas mortos de *Leishmania amazonensis* é extensiva à via intranasal (mais conveniente que a via oral), à outras espécies de *Leishmania* e à outras cêpas de camundongos.

### **2.2) Objetivos específicos**

1. Verificar a eficácia da vacinação in com LaAg na leishmaniose cutânea murina em camundongos BALB/c e C57BL/6; bem como a duração da proteção.
2. Monitorar a resposta de produção de citocinas nos linfonodos drenantes da lesão e da mucosa nasal durante a infecção;
3. Verificar a importância do sítio de infecção;
4. Verificar a proteção cruzada pela utilização de antígenos totais de diferentes espécies de *Leishmania*.

### 3- Metodologia

**3.1) Parasitos** – Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (designação MHOM/BR/75/JOSEFA), *Leishmania donovani* Ld1S, *L.major* LV 39 (designação MRHO/SU/59/P) e *L.braziliensis* (designação MHOM/BR/96/H3456) foram mantidas em cultura a 26°C em meio de cultura D-MEM (Sigma Chemical Co) suplementado com penicilina (Cultilab) 50U/mL, estreptomicina (Cultilab) 50µg/mL e HEPES (Sigma Chemical Co.) a 20 mM com 10% de soro fetal bovino inativado a 56°C (Cultilab). Para infecção, foram utilizadas promastigotas de *Leishmania amazonensis* transfectadas com o gene de GFP (Green Fluorescent Protein) (Rossi-Bergmann *et al*, 1999) em fase estacionária (com cerca de 3 a 4 dias de cultura). Os parasitos transfectados foram periodicamente mantidos em meio de cultura com 100 µg/mL de geneticina para seleção dos parasitos fluorescentes. Para garantir a infectividade, os parasitos foram utilizados no máximo até a quarta passagem, quando eram então re-isolados por punção de lesões de camundongos BALB/c experimentais infectados.

### 3.2) Antígenos/Vacinas

**LaAg, LdAg, LmAg e LbAg: LaAg.** Promastigotas de *L. amazonensis* no início da fase estacionária de crescimento foram lavados três vezes por centrifugação a 1300g por 10 minutos com PBS. As células precipitadas foram ressuspensas em PBS e submetidas a 3 ciclos de congelamento-descongelamento. O lisado obtido foi denominado LaAg e estocado a -20°C até o uso. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry. Os antígenos de *L.donovani* (LdAg), *L.major* (LmAg) e *L.braziliensis* (LbAg) foram obtidos a partir da mesma metodologia. As dosagens em termos de proteínas totais das formulações concentradas obtidas foram as seguintes: LaAg: 5 mg/mL; LdAg: 0,86 mg/mL; LmAg:

4,17 mg/mL; LbAg: 4,18 mg/mL. No momento do uso, os antígenos foram diluídos a 500µg/mL em PBS 1X, a fim de que a dose administrada fosse de 10 µg em 20 µL.

**3.3) Animais:** Camundongos da linhagem BALB/c (obtidos do Laboratório de Animais Transgênicos da Fundação Bio Rio) e C57BL/6 originários de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) foram mantidos com água purificada e ração comercial e maravalha autoclavada. Os animais eram utilizados com idade entre 8 e 10 semanas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de uso de animais do Instituto de Biofísica.

**3.4) Imunização Nasal:** Os camundongos mantidos com a cabeça levemente retrovertida receberam por instilação nasal 10µg (em termos de proteína) de LaAg, LdAg, LmAg ou LbAg (conforme indicado) em 20µL de PBS(10 µl em cada narina), utilizando uma micropipeta e ponteira estéril. Os animais receberam 7 dias depois a mesma dose como reforço. Os animais controle receberam 20µL PBS.

**3.5) Infecção:** Os animais foram infectados 1 semana , 4 semanas ou 4 meses após a última dose da vacina, conforme indicado, com  $10^5$  promastigotas de *L.amazonensis* GFP no coxim plantar da pata direita traseira (20 µl) ou na orelha direita (10 µl). O curso da infecção foi acompanhado pela medida da lesão com paquímetro (Mitutoyo, Brasil) nos dias indicados. O tamanho da lesão foi calculado pela diferença entre a espessura das patas ou orelhas infectadas e as patas ou orelhas contralaterais não infectadas. Nos casos onde a carga parasitária foi determinada, as patas infectadas foram cortadas e homogeneizadas individualmente em 2 mL de PBS. Após centrifugação, 200 µL da suspensão foi transferida

para microplacas e a fluorescência medida no fluorímetro a 435 nm (excitação)/538 nm (emissão) (Rossi-Bergmann *et al*, 1999).

**3.6) Citocinas:** Os linfonodos poplíteos (drenante da lesão) ou cervicais (drenantes do sítio de imunização, e conforme indicado, da lesão) dos camundongos foram isolados assepticamente e macerados com PBS gelado. As suspensões de células foram centrifugadas a 500 x g/ 7 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 1 mL de D-MEM e o número de células vivas foram contadas em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por azul de Tripán. O número de células vivas foi ajustado para o desejado ( $4 \times 10^6$  células/mL), em D-MEM e 10% de soro fetal bovino inativado. As células foram então plaqueadas em triplicatas em placas de 24 poços, em 1 mL de volume final e estimuladas com Concanavalina A (ConA, Sigma Aldrich, USA), por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Deve-se notar que ConA foi utilizada para estimulação das células dos animais vacinados com LaAg devido a dificuldade de re-estimular as células destes animais vacinados com LaAg *in vitro* (Pinheiro *et al*, 2004). Após a incubação, as células foram então centrifugadas a 500 x g /10 minutos na própria placa e os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e estocados a -20°C para dosagem de citocinas. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram medidos por ELISA, em duplicata, utilizando anticorpos pareados de captura e de detecção marcados com peroxidase, de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, USA). A absorvância foi lida a 450 nm e os dados convertidos em concentração por interpolação com a curva padrão de citocinas murinas recombinantes.

**3.7) Reação de Hipersensibilidade:** Uma semana ou quatro meses após a dose de reforço, conforme indicado, animais imunizados pela via nasal, foram inoculados na pata com 20 $\mu$ g LaAg em 20  $\mu$ l PBS. A medida da espessura da pata foi efetuada com um paquímetro nos tempos indicados e expressa como a diferença entre as espessuras das patas inoculadas com 20  $\mu$ l PBS

**3.8) Análise Estatística:** Os resultados foram analisados pelo método t de Student,. Os resultados descritos como significativamente diferentes tiveram  $p \leq 0,05$ .

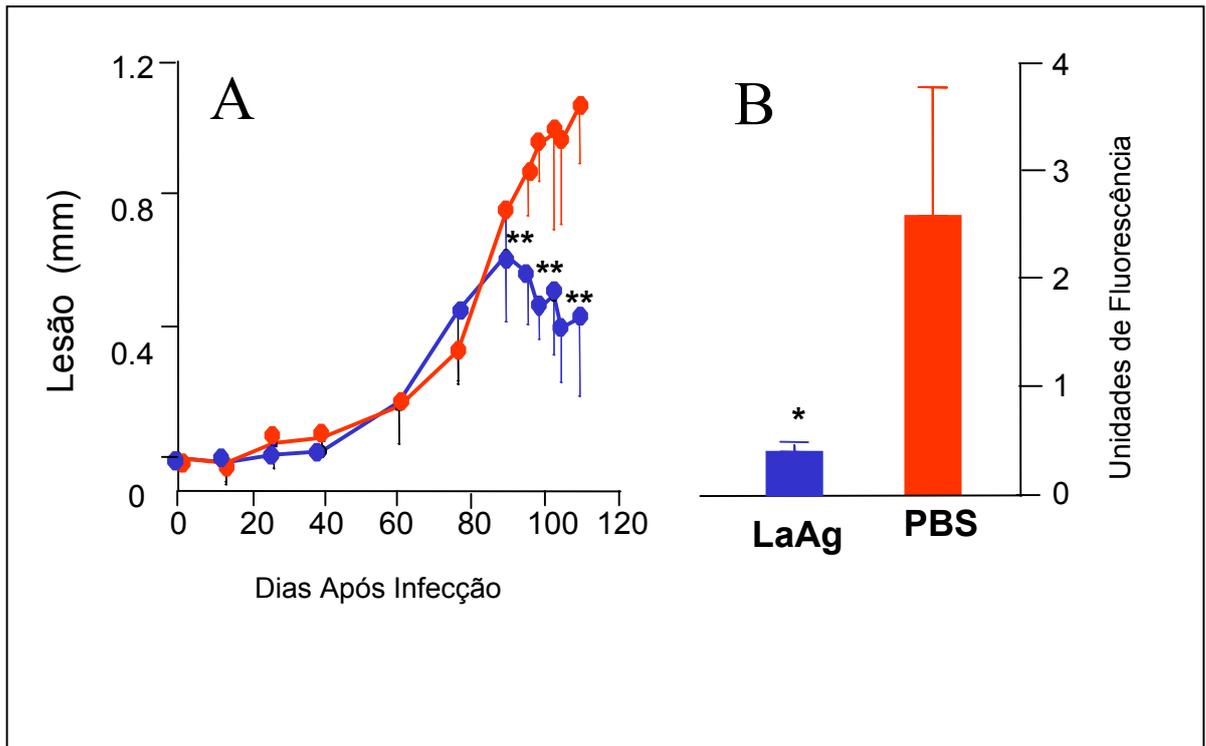
#### 4- Resultados

##### ***4.1) Vacinação intranasal com LaAg confere proteção contra infecção por L. amazonensis em camundongos BALB/c***

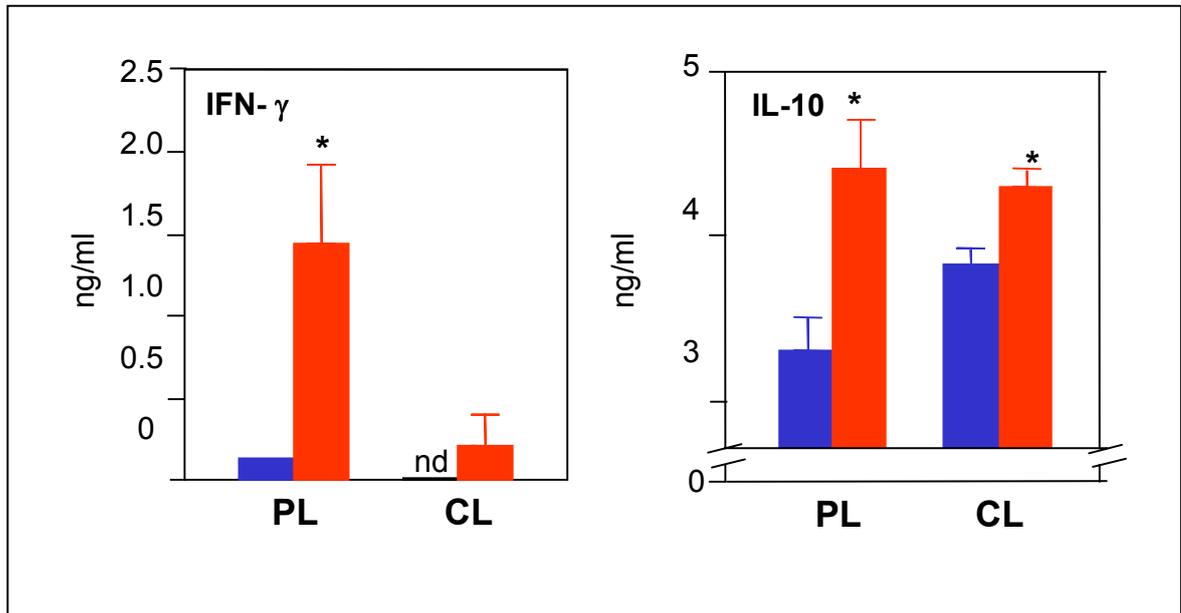
Foi previamente demonstrado que a imunização oral utilizando LaAg era capaz de induzir proteção contra infecção por *L. amazonensis* tanto em camundongos C57 BL/6 quanto em camundongos BALB/c (Pinto *et al*, 2003). Para avaliar se a via de mucosa nasal poderia ser também utilizada para administração deste antígeno apresentando o mesmo efeito protetor observado para a imunização pela mucosa oral, camundongos BALB/c foram imunizados com duas doses de LaAg (10µg/dose), com intervalo de 1 semana entre as mesmas, e, após 1 semana da dose de reforço, os camundongos foram infectados, subcutaneamente, com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*, na pata traseira. A Figura 1A demonstra que os animais vacinados foram capazes de controlar a infecção após um período de 80 dias, durante os quais a lesão cresceu de forma similar a do controle. Após 110 dias de infecção, os animais foram eutanasiados, e a carga parasitária avaliada pela fluorescência das patas maceradas. A proteção conferida pela vacina foi confirmada pela reduzida carga parasitária (Fig 2A) observada nos animais imunizados. Estes resultados demonstram que a vacinação intranasal com LaAg foi capaz de conferir proteção aos animais imunizados contra infecção por *L. amazonensis*.

A fim de se determinar o perfil das citocinas produzidas pelos animais imunizados, as células do linfonodo poplíteo (linfonodo drenante do sítio de infecção) e do linfonodo cervical (linfonodo drenante da mucosa nasal) foram obtidas no dia 110, e mantidas em cultura por 48 horas sob estímulo de Concanavalina A (2,5µg/mL), a 37°C, conforme descrito na metodologia. O sobrenadante das culturas em questão foi coletado e as citocinas foram dosadas por ELISA. Conforme demonstrado na figura 2, os

camundongos imunizados produziram altas concentrações de IFN- $\gamma$  nos linfonodos poplíteos (LNPs) em comparação aos animais do grupo controle, embora tenham produzido mais IL-10.



**Fig 1** – Efeito protetor da imunização nasal com LaAg contra infecção subsequente com *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram vacinados pela via intranasal com duas doses de 10 $\mu$ g de LaAg e receberam uma dose de reforço 7 dias depois. (● e barra azul). Os controles receberam somente PBS (● e barra vermelha). Uma semana após a dose de reforço cada um dos animais foi infectado com 10<sup>5</sup> promastigostas de *L. amazonensis* GFP na pata traseira. (A) Tamanho das lesões nos diferentes dias. (B) No dia 110 de infecção, as cargas parasitárias das patas individuais foi expresso em unidades de fluorescência. Os valores são expressos como Média  $\pm$  DP (n=5). (\*) P $\leq$  0,05.



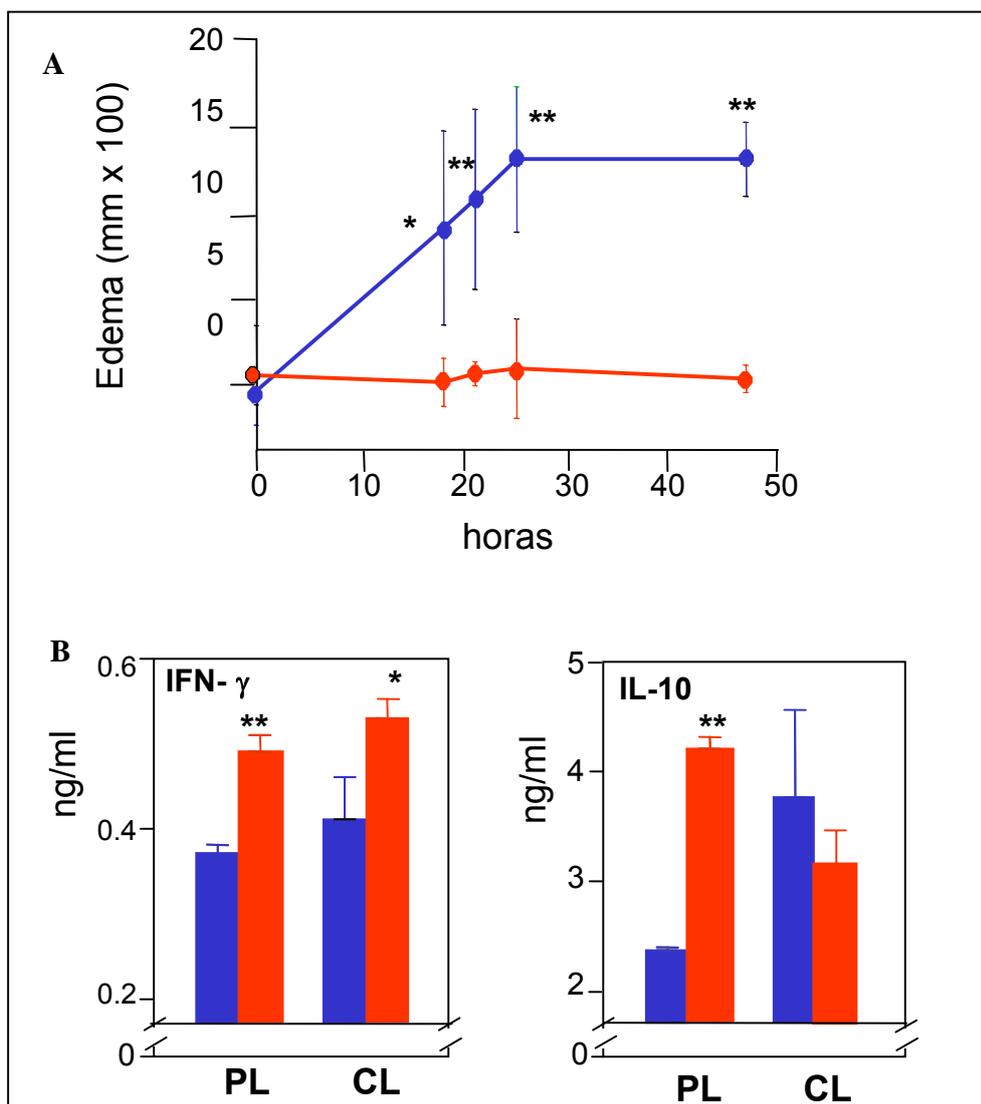
**Fig. 2** – Produção de citocinas por camundongos infectados 1 semana após a vacinação com LaAg. Camundongos (n=5) foram vacinados pela via intranasal com LaAg (barras vermelhas) ou somente com PBS (barras azuis) antes da infecção, conforme descrito na Fig. 1. No dia 110 de infecção, os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 produzidos por células de linfonodos cervical (LC) e poplíteo (LP) estimuladas por ConA (2,5  $\mu$ g/mL) foi medido nos sobrenadantes das culturas por ELISA. OS valores são as Médias  $\pm$  DP para amostras em triplicata. (\*)  $P \leq 0,05$  para uma comparação com os controles. Nd, não detectado.

#### **4.2) LaAg administrado pela via intranasal induz uma memória imunológica duradoura contra infecção por L. amazonensis em camundongos BALB/c**

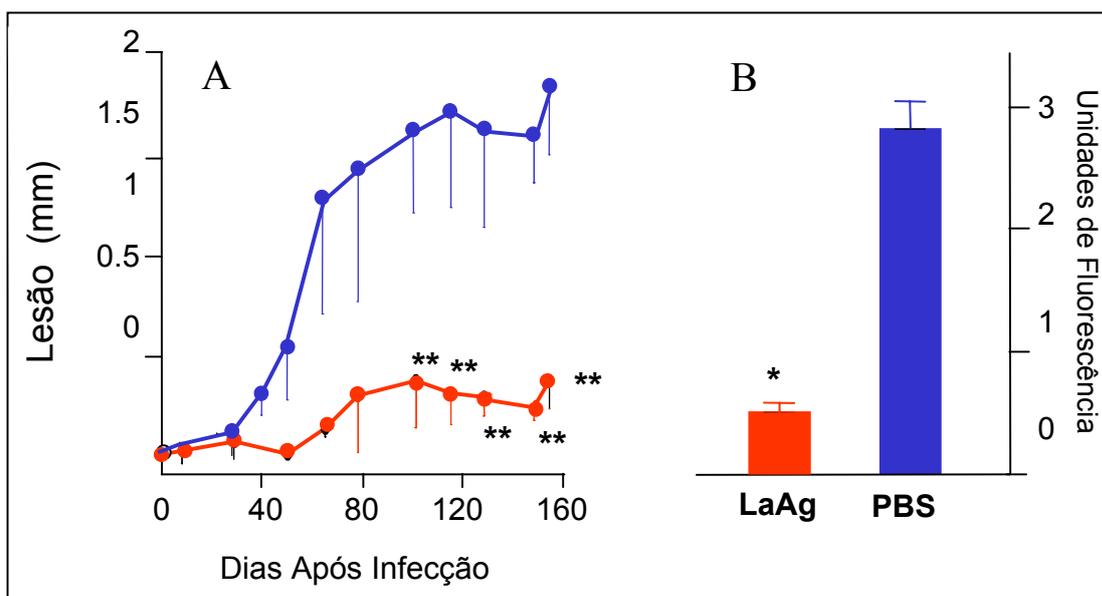
Uma vacina bem sucedida deve ser capaz de suscitar uma memória imunológica duradoura. No caso da leishmaniose cutânea, importantes marcadores de proteção, estão relacionados às respostas do tipo Th1, tais como a produção de IFN- $\gamma$  e uma resposta de hipersensibilidade tardia. Estas respostas foram avaliadas 4 meses após a vacinação com LaAg. Na figura 3 é demonstrado que animais vacinados com LaAg, pela via intranasal, conforme o protocolo da seção anterior apresentaram uma resposta de hipersensibilidade tardia após desafio com antígeno, 4 meses após a última imunização com LaAg. A cinética da DTH dos animais imunizados apresentou um pico de resposta em 24 horas, que foi mantido até, pelo menos, 48 horas após o desafio (Fig 3A). Os animais controle não apresentaram tal resposta. Adicionalmente, verificou-se um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  tanto pelas células do LP quanto pelas células do LC (Fig 3B), que era compatível com a resposta de DTH *in vivo*, mesmo com os níveis de IL-10 aumentados no LP.

A proteção duradoura sugerida pelos dados acima foi comprovada pelo curso da infecção de camundongos infectados com *L. amazonensis* na pata traseira 4 meses após a última imunização, utilizando o protocolo da seção anterior. Nos 160 dias durante os quais a lesão foi acompanhada (Fig 4A), verificou-se que os camundongos vacinados foram capazes de controlar a infecção desde o início, enquanto, os camundongos que receberam somente PBS desenvolveram lesões crescentes. O controle da infecção foi comprovado pela redução na carga parasitária dos camundongos imunizados com LaAg em comparação aos camundongos controle (Fig 4B). Após o dia 160 de infecção, os camundongos foram eutanasiados e a produção de citocinas nos LP e LC foi avaliada (Fig 5). Verificou-se que os níveis de IFN- $\gamma$ , mas não os níveis de IL-10, encontravam-se aumentados no LP dos

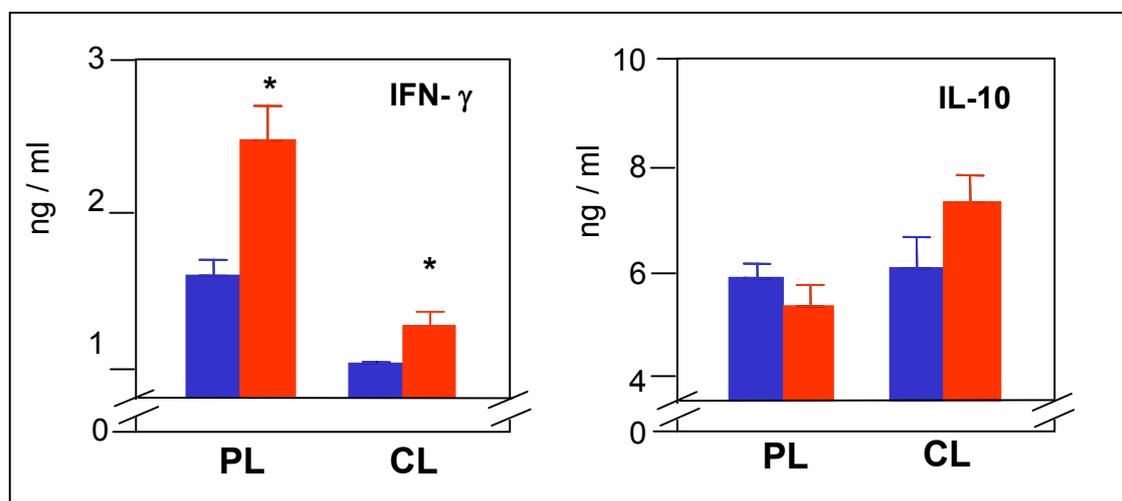
animais vacinados, sugerindo que os níveis elevados de IFN- $\gamma$  estão relacionados ao controle da infecção. Embora não tão pronunciados, os níveis de IFN- $\gamma$  também encontravam-se elevados no LC, demonstrando que mesmo após um longo período o sítio associado à mucosa ainda encontrava-se sensibilizado.



**Fig. 3** – Resposta de hipersensibilidade e produção de citocinas 4 meses após a vacinação intranasal. Camundongos (n=9) receberam LaAg (● e barras vermelhas) ou somente PBS (● e barras azuis), como descrito na legenda da Fig 1 (A). Quatro meses após a dose de reforço, os camundongos foram desafiados nas patas com 20 $\mu$ g de LaAg, e o edema local foi avaliado em diferentes tempos. (B) os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 produzidos pelas células do LP e LC foram avaliados nos sobrenadantes das culturas (n=4), das células estimuladas por ConA (2,5  $\mu$ g/mL). Os valores são média  $\pm$  DP. (\*)  $P \leq 0,05$ . (\*\*)  $P \leq 0,02$ .



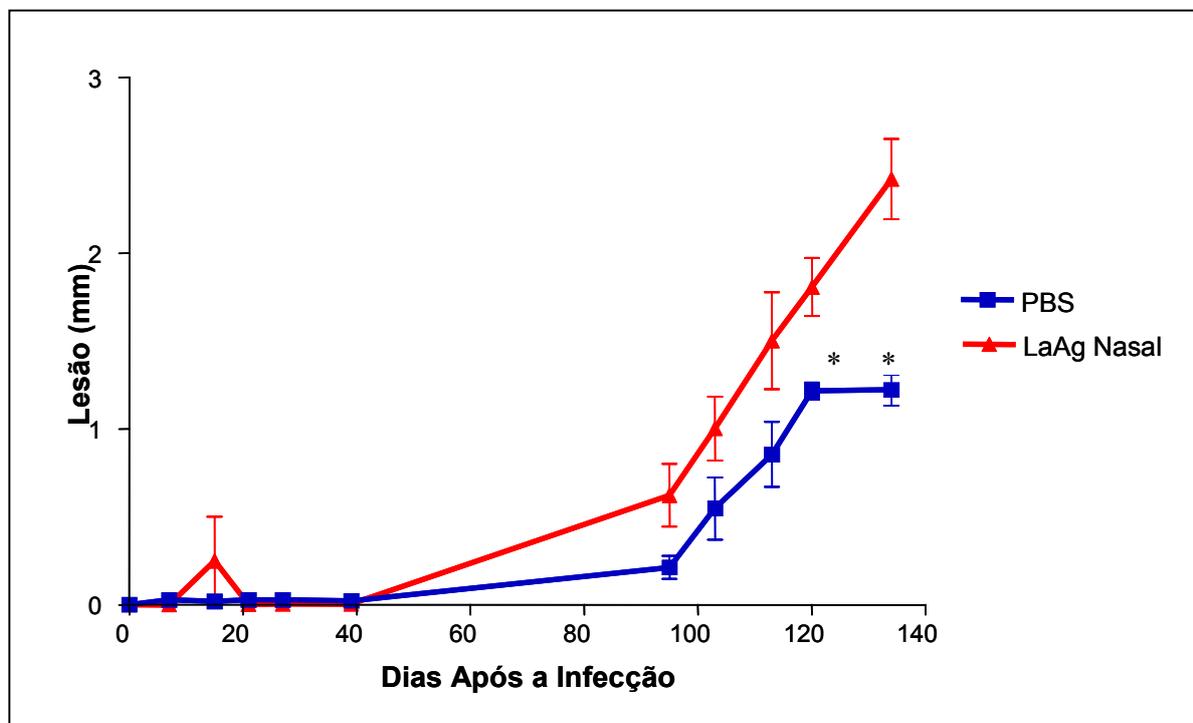
**Fig 4** – Efeito protetor duradouro da vacinação com LaAg intranasal. Camundongos BALB/c foram vacinados pela via intranasal com duas doses de 10 $\mu$ g de LaAg e receberam uma dose de reforço 7 dias depois (● e barra negra). Os controles receberam somente PBS (○ e barra cinza). Quatro meses após a dose de reforço, os animais foram infectados com 10<sup>5</sup> promastigostas de *L.amazonensis* GFP na pata traseira. (A) O crescimento da lesão foi acompanhado por um período de 160 dias. (B) No dia 160 de infecção, as cargas parasitárias nas patas infectadas foram expressas em unidade de fluorescência. Os valores são expressos em Média  $\pm$  DP (n=5). (\*)P $\leq$ 0,01. (\*\*) P $\leq$  0,05.



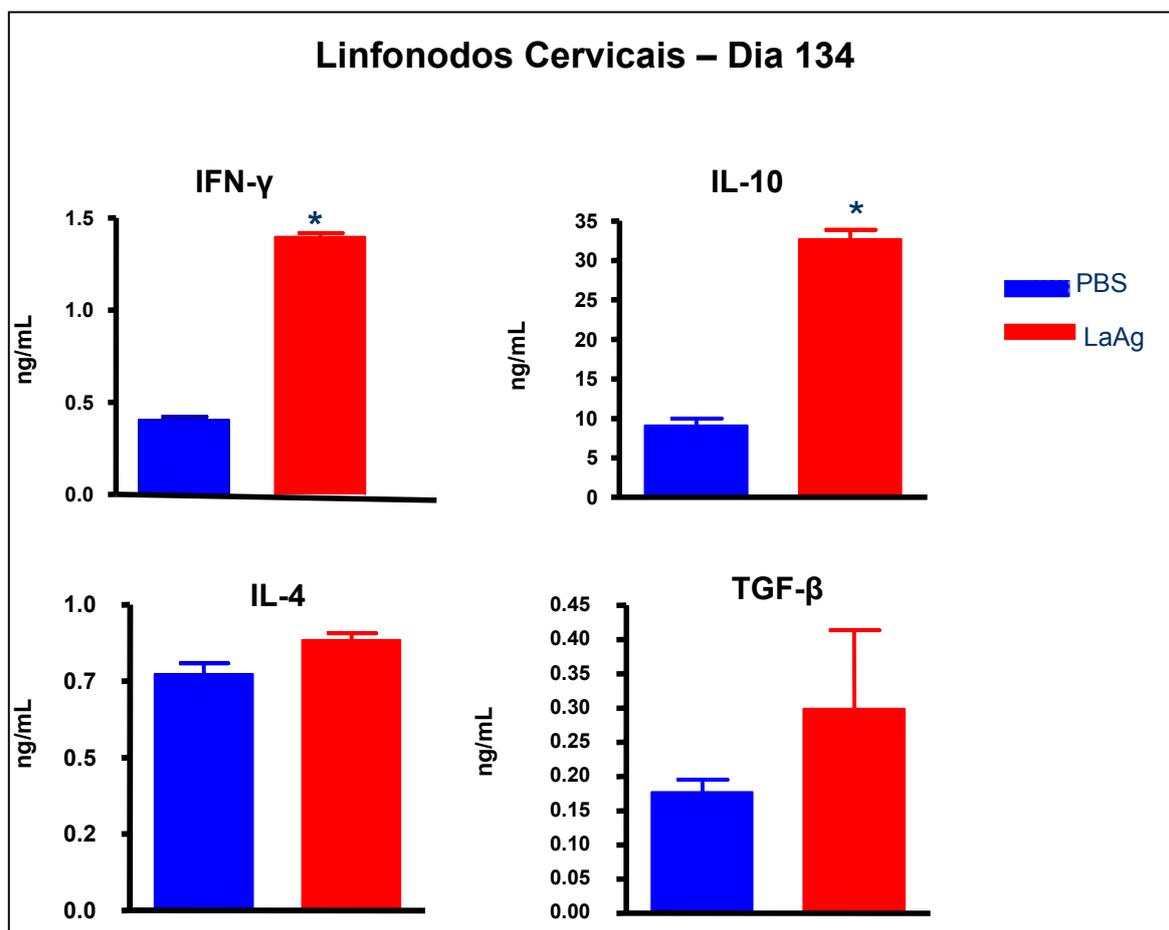
**Fig. 5** – Produção de citocinas por camundongos infectados 4 meses após vacinação. Camundongos (n=5) foram imunizados pela via intranasal com LaAg (barras pretas) ou receberam PBS (barras cinzas) e foram infectados como descrito na legenda da Fig. 4. No dia 160 de infecção, os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  produzidos pelas células dos LP e LC foram avaliados por ELISA. Os valores são expressos em Média  $\pm$  DP das amostras em triplicata. (\*) P  $\leq$  0,05.

#### ***4.3) Influência do Sítio de Infecção na Eficiência da Vacinação Intranasal em Camundongos BALB/c***

Devido ao sucesso da imunização intranasal com LaAg ter sido verificado em lesões nas patas (Fig. 1), decidiu-se verificar se havia influência do sítio de infecção na proteção conferida pela vacinação. Os animais imunizados com LaAg foram então infectados nas orelhas, sítio também drenado pelos linfonodos cervicais, 4 semanas após a imunização de reforço. Foi verificado que camundongos imunizados 1, 2 ou 4 semanas após a dose de reforço da vacina não apresentavam diferenças em suas respostas (dados não mostrados). Os linfonodos cervicais drenam um sítio de mucosa, e por isso apresentam um microambiente diferenciado em comparação aos sítios que não são de mucosa. O que se verificou foi que os animais imunizados apresentaram um aumento na lesão por *L.amazonensis* em comparação ao grupo não imunizado (Fig. 6), que foi acompanhado por aumento dos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  (Fig. 7).



**Fig. 6-** Influência do sítio de infecção na eficiência de LaAg na indução de proteção contra leishmaniose tegumentar murina. Camundongos BALB/c (n=4) foram imunizados pela via IN com duas doses de LaAg (10  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ) ( $\blacktriangle$ ) nos dias -35 e -28. O grupo controle recebeu PBS ( $\blacksquare$ ) No dia 0, os animais foram infectados na orelha direita com  $2 \times 10^5$  *L.amazonensis*, e a infecção acompanhada por paquimetria até o dia 134. Media  $\pm$  EP. (\*)  $P < 0,05$ .



**Fig. 7** – Produção de citocinas pelo linfonodo cervical de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* na orelha. Os animais receberam LaAg (coluna vermelha) pela via IN conforme descrito, e o grupo controle recebeu PBS (coluna azul). Após 134 dias de infecção, os linfonodos dos animais foram removidos, e a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  foi avaliada por ELISA. Média  $\pm$  EP de amostras em duplicata. (\*)  $P < 0,05$ .

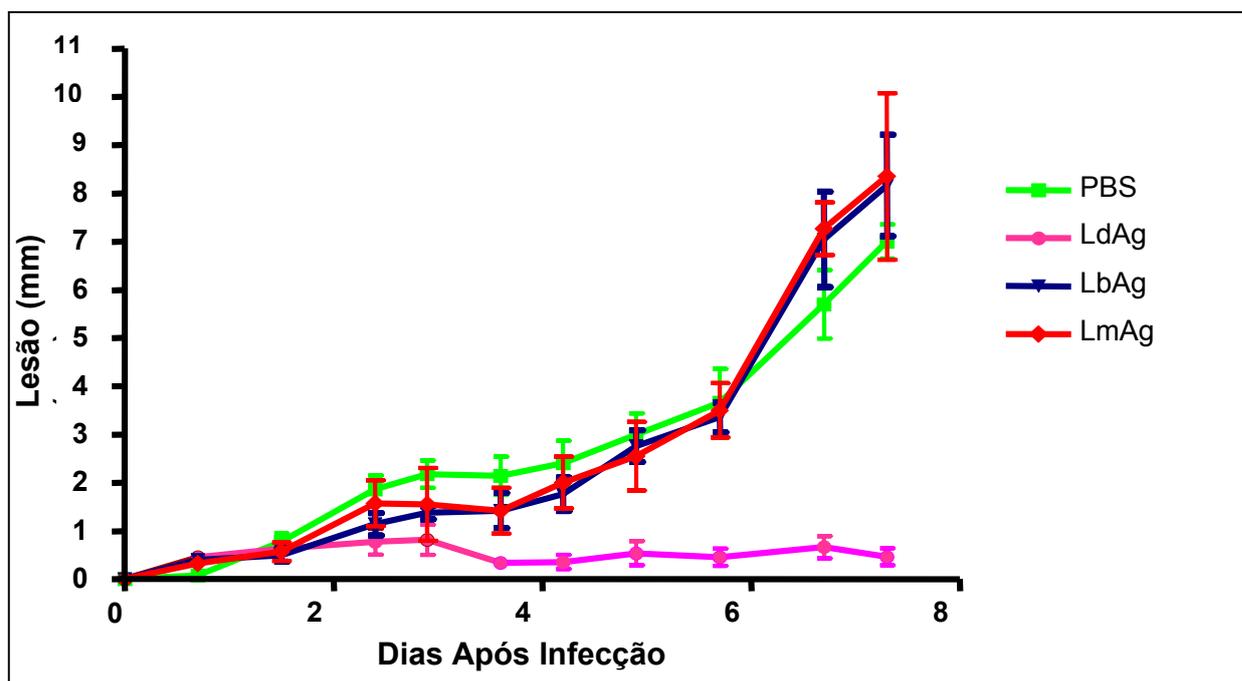
#### **4.4) Efeito da Imunização Intranasal Cruzada com Antígenos de Leishmania sp na Proteção contra infecção por Leishmania amazonensis em camundongos BALB/c**

Tendo em vista que a vacinação intranasal utilizando LaAg conferiu a proteção aos camundongos imunizados, resolvemos verificar se antígenos totais de outras espécies de *Leishmania* seriam capazes de conferir proteção contra *L.amazonensis* por meio de vacinação intranasal. Já foi relatado na literatura que uma infecção com *L. donovani* em macacos Vervet foi capaz de promover proteção heteróloga contra uma infecção por *L.major* (Gicheru *et al*, 1997). Assim, os antígenos totais de *L. donovani* (LdAg), *L.major* e *L. braziliensis* foram testados como descrito para LaAg. Cabe mencionar que os camundongos foram infectados duas semanas após a dose de reforço, e que camundongos imunizados 1 ou 2 semanas após a dose de reforço da vacina não apresentavam diferença em suas respostas (dados não mostrados).

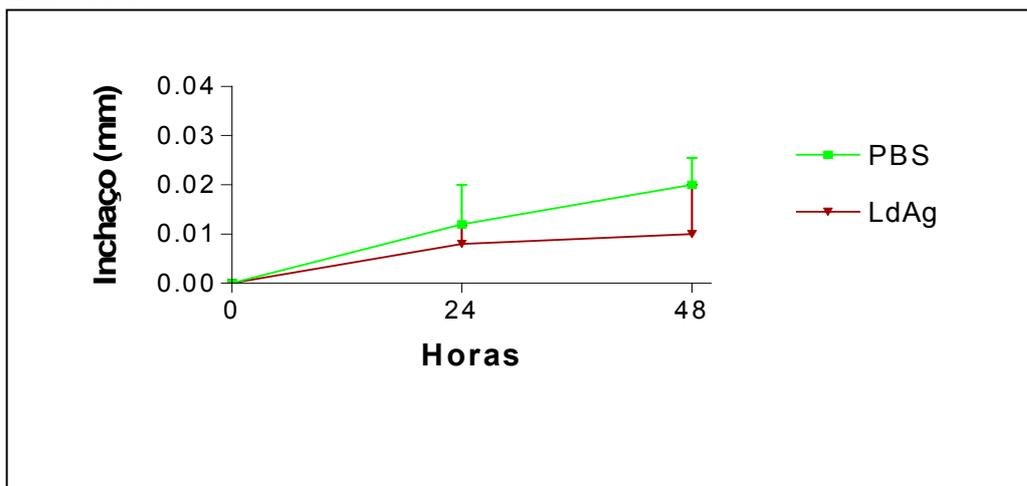
Após 73 dias de infecção, observamos que o LdAg foi o único antígeno total que promoveu proteção praticamente total aos animais imunizados, não só pela redução drástica do crescimento da lesão (Fig. 8), como também pela reduzida carga parasitária (Fig. 10). Também verificamos que o LdAg i.n. não foi capaz de promover uma resposta de hipersensibilidade tardia (Fig. 9), diferente do que foi observado para LaAg (Pinto, 2004).

Em termos de citocinas, foi curioso notar que a imunização com LdAg promoveu um aumento da produção de TGF- $\beta$  e concomitante redução de IFN- $\gamma$  nos linfonodos poplíteos no dia 82 de infecção (Fig.11) em relação ao controle não imunizado. O papel deletério do TGF- $\beta$  na leishmaniose já foi descrito anteriormente (Barral *et al*, 1993; Pinheiro *et al*, 2005). Deste modo, deveria haver alguma outra citocina envolvida no papel protetor observado. O TNF- $\alpha$  parece ser capaz de reverter o efeito supressor de TGF- $\beta$  *in vitro* na infecção por promastigotas de *L. braziliensis* (Barral *et al*, 1995), além de apresentar um importante papel protetor na leishmaniose tegumentar (Titus *et al*, 1989). Por

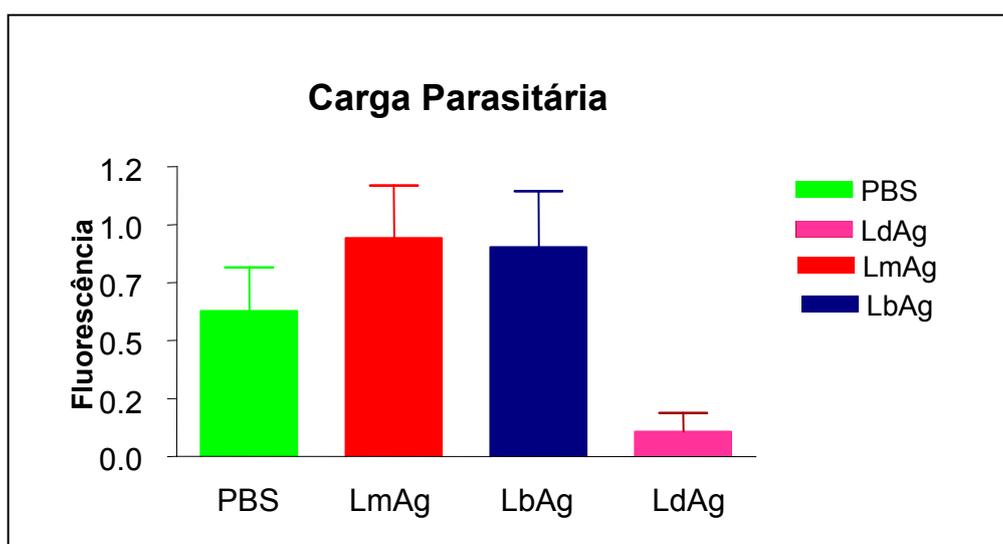
estas razões os níveis desta citocina foram dosados, e, surpreendentemente, estes se encontravam aumentados tanto no linfonodo poplíteo (Fig. 12A) quanto no linfonodo cervical (Fig. 12B) dos animais imunizados com LdAg, demonstrando um possível efeito protetor disseminado desta citocina.



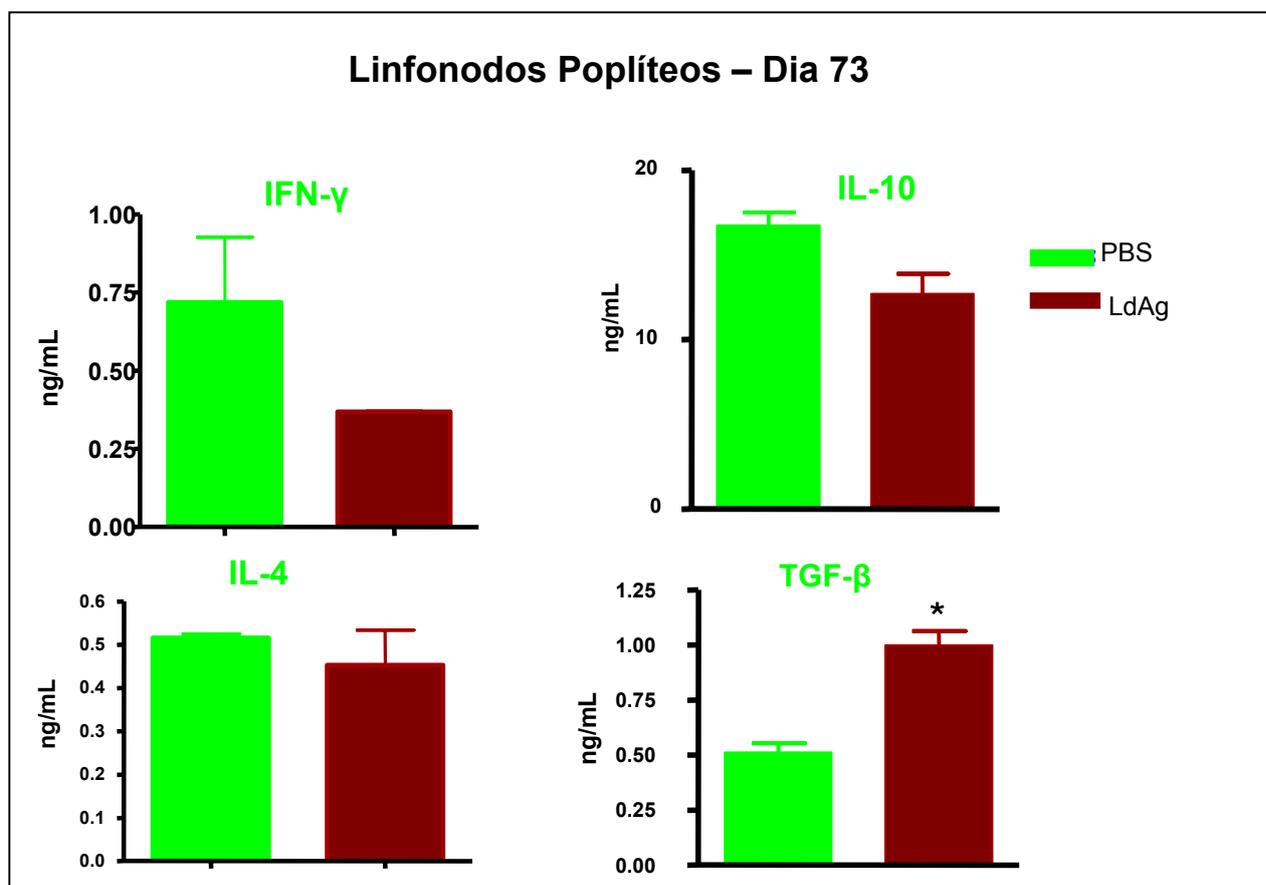
**Fig. 8** – Proteção cruzada conferida pela pré-imunização com antígeno total de *L. donovani* contra infecção por *L. amazonensis*. Animais BALB/c (n=5) foram pré-imunizados com duas doses de 10 $\mu$ g cada de antígeno total de *L. major*, *L. barziliensis* e *L. donovani*, em intervalos de 1 semana entre as doses. Duas semanas após a última imunização intranasal os animais foram infectados na pata direita com  $2 \times 10^5$  *L. amazonensis* GFP e a lesão foi acompanhada por paquimetria até o dia 73. Média  $\pm$  EP.



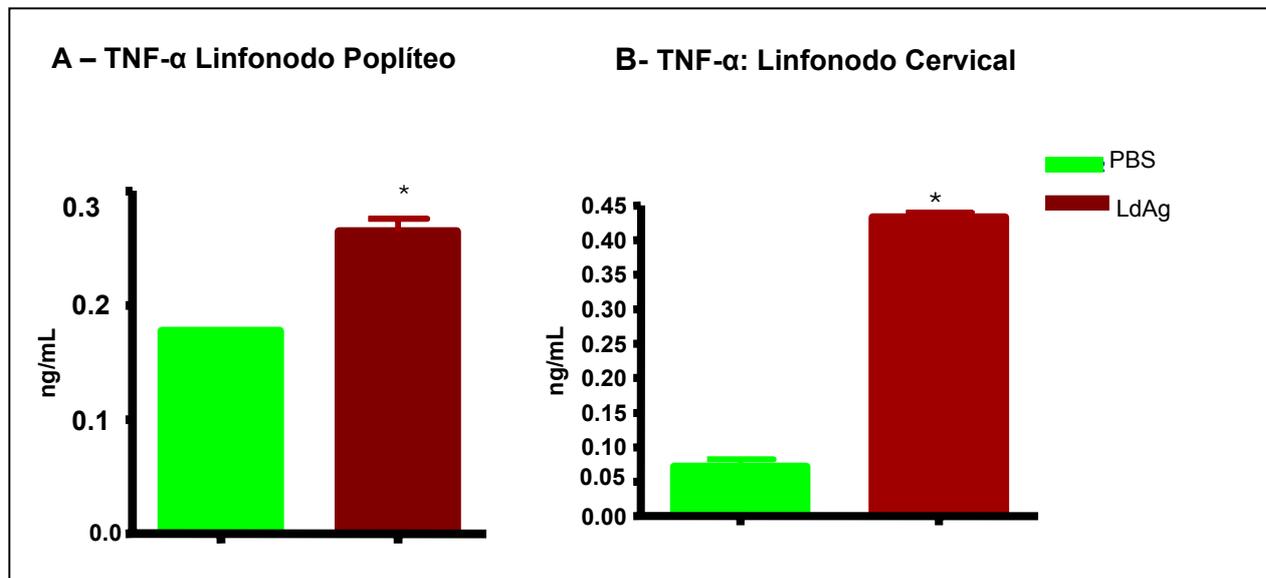
**Fig. 9** – Camundongos BALB/c foram imunizados com LdAg (■) ou PBS (■) pela via intranasal e infectados com  $2 \times 10^5$  *Leishmania amazonensis* GFP, em 20  $\mu$ L de PBS na pata direita, e, receberam na pata esquerda 20  $\mu$ L de PBS. A diferença entre o inchaço das patas que receberam PBS e aquelas que foram infectadas foi avaliada em 24 e 48 horas após este procedimento.



**Fig. 10** – Camundongos BALB/c imunizados com LdAg, LmAg, LbAg ou PBS pela via intranasal e infectados conforme descrito anteriormente. Os animais foram sacrificados no dia 73 após a infecção, e tiveram suas patas removidas e a carga parasitária avaliada por fluorescência, em triplicata, como metodologia descrita. Média  $\pm$  EP (\*) $P < 0,05$ .



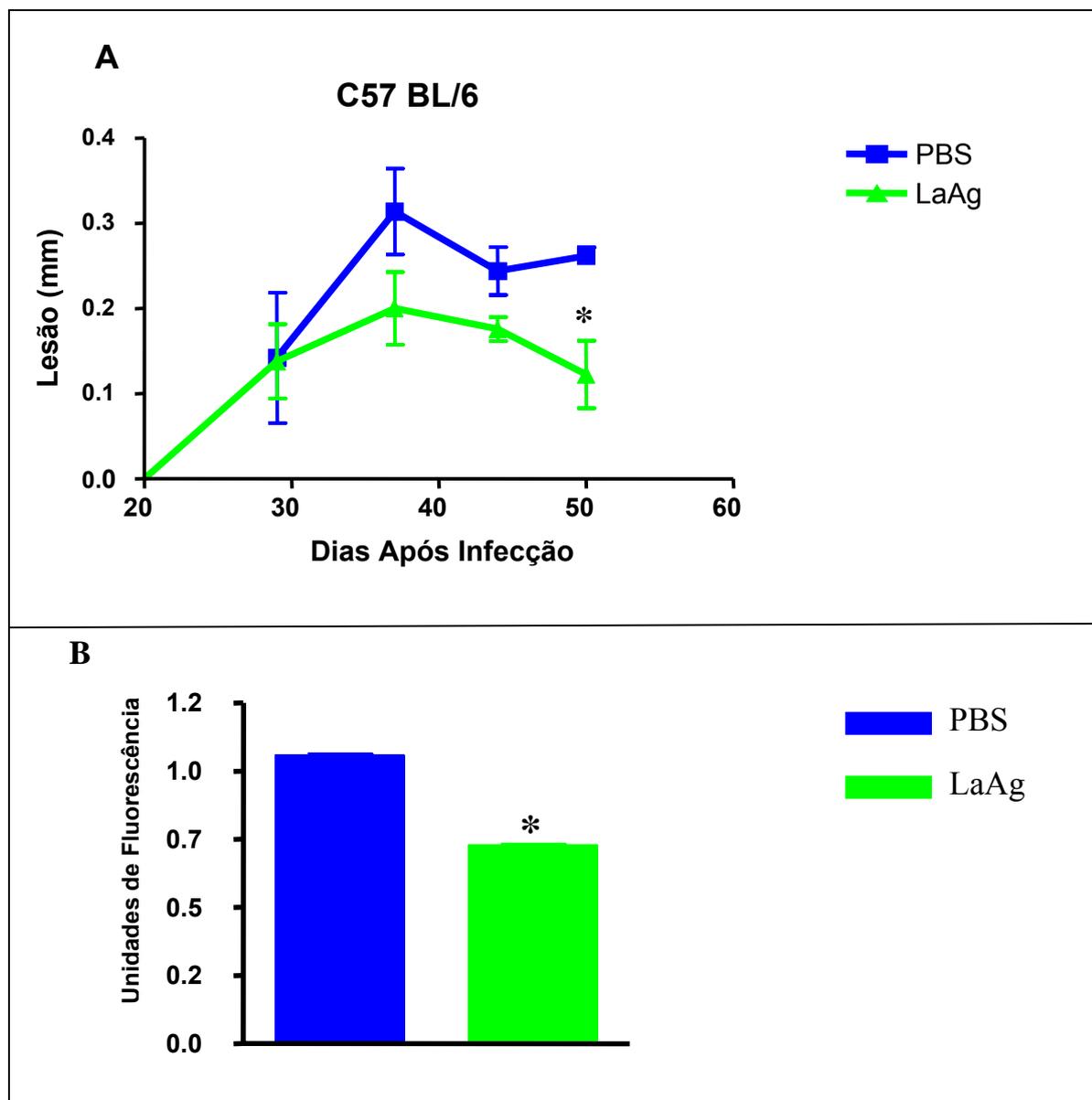
**Fig. 11** - Produção de citocinas pelos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c (n=4) infectados com *Leishmania amazonensis* na pata direita. Os animais receberam LdAg (coluna marrom) pela via IN conforme descrito, e o grupo controle recebeu PBS (coluna verde). Após 73 dias de infecção, os linfonodos dos animais foram removidos, e a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  foi avaliada por ELISA. Média  $\pm$  EP de amostras em duplicata. (\*)  $P < 0,05$ .



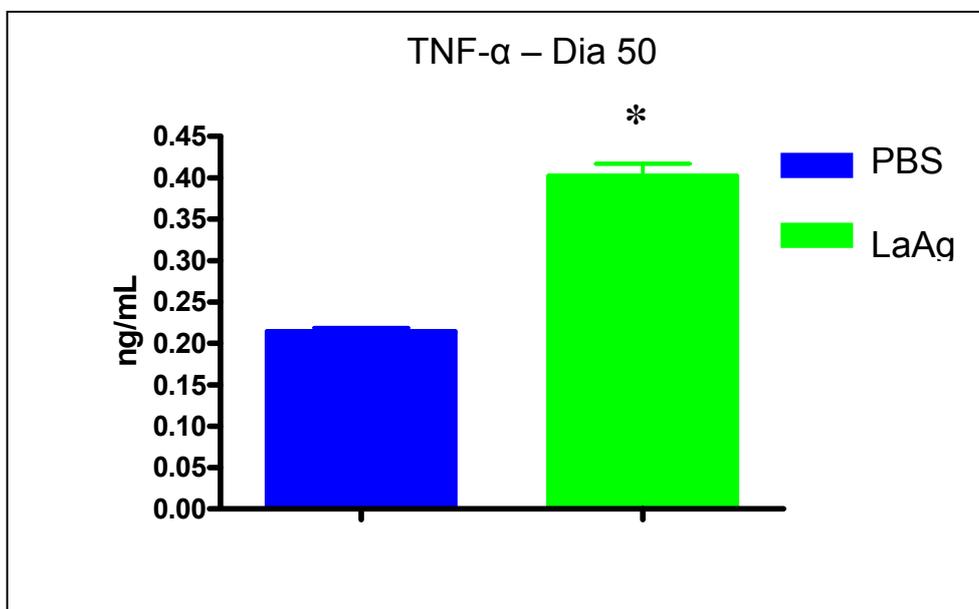
**Fig. 12-** Influência do TNF-  $\alpha$  na proteção cruzada conferida por LdAg intranasal na leishmaniose tegumentar em camundongos BALB/c. O níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados por ELISA em sobrenanates de cultura de células de linfonodo poplíteo (LP) (A) e linfonodo cervical (LC) (B) 73 dias após o início da infecção. Média  $\pm$ EP de amostras em duplicata. (\*)  $P < 0,05$ .

#### **4.5) Influência do TNF- $\alpha$ na imunização com LaAg intranasal em camundongos C57BL/6**

Os resultados desta dissertação de que o LaAg intranasal induz resposta protetora em camundongos BALB/c, nos levaram a questionar se este efeito também poderia ser verificado em camundongos C57 BL/6, pois no caso da vacinação oral o efeito protetor de LaAg foi observado em ambas as cepas (Pinto *et al*, 2003). Sendo assim, resolvemos avaliar o efeito do LaAg em camundongos C57BL/6. Os animais foram vacinados da mesma forma descrita anteriormente, e infectados 7 dias após à dose de reforço. Observamos que da mesma forma observada em camundongos BALB/c, os camundongos C57 BL/6 vacinados mostraram um crescimento mais baixo da lesão (Fig. 13A) e menor carga parasitária (Fig. 13B). Decidiu-se verificar se o TNF- $\alpha$  também seria um fator importante na proteção contra infecção, conforme observado na proteção com LaAg (Fig.8). No dia 50 de infecção, a produção de TNF-  $\alpha$  pelas células dos linfonodos pré-ileais era praticamente o dobro em comparação a camundongos não imunizados (Fig. 14).



**Fig. 13-** Vacinação intranasal de camundongos C57Bl/6 com LaAg. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com uma dose de 10  $\mu\text{g}$  de LaAg pela via IN nos dias -14 e -7 ( $\blacktriangle$ ). Os animais dos grupos controle receberam PBS IN ( $\blacksquare$ ). No dia 0 os animais foram infectados na pata direita com  $2 \times 10^5$  *L. amazonensis* GFP. A lesão foi acompanhada por paquimetria até o dia 50, (A), quando os animais foram sacrificados e suas patas infectadas foram removidas e maceradas a fim de se aferir a carga parasitária (B) avaliada por fluorescência. Média  $\pm$  EP (n=5) (\*)  $P < 0,05$ .



**Fig. 14** – Produção de TNF- $\alpha$  por células isoladas de linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 vacinados pela via i.n. com LaAg, e infectados conforme descrito anteriormente. A produção de TNF- $\alpha$  por ELISA no sobrenadante de células de linfonodo poplíteo reestimuladas *in vitro* com ConA por 48 horas, 37°C e 4% de CO<sub>2</sub>. Média  $\pm$  EP. (\*)P<0,05

### 5-Discussão

Foi previamente demonstrado que a administração intramuscular de promastigotas mortas de *L.amazonensis* (LaAg) levava a um agravamento da lesão cutânea dos camundongos BALB/c imunizados em comparação ao controle (Pinheiro *et al*, 2005). Por outro lado, já havia sido previamente verificado que a administração de LaAg pela via oral protegia os tanto camundongos BALB/c quanto C57 BL/6 da infecção por *L.amazonensis* (Pinto, *et al*, 2003). A proteção observada foi associada a um aumento da produção de IFN- $\gamma$  nos LPs e uma concomitante supressão da resposta imune do tipo Th2.

Uma vez que as várias mucosas são moduladas por um sistema imunológico comum, no presente trabalho explorou-se as potencialidades da via de mucosa nasal na indução da proteção contra a infecção por *L.amazonensis* por sua vantagem de produzir menor degradação química e enzimática da vacina que a via oral. Verificamos que a imunização com uma dose 10 vezes menor de LaAg que a utilizada no trabalho anterior de vacinação oral (100  $\mu$ g) foi também eficaz em proteger os camundongos BALB/c contra *L.amazonensis* (Fig 1A e 1B). Foi interessante observar que os camundongos vacinados pela via intranasal demoraram mais para controlar a infecção que os camundongos que receberam LaAg oralmente, mas os primeiros controlaram a infecção de forma mais intensa. É possível que o controle tardio da infecção tenha ocorrido devido a um tempo de latência necessário para que ocorresse uma resposta eficaz de IFN- $\gamma$ . Sabe-se que são necessários níveis supra-ótimos de IFN- $\gamma$  para que ocorra uma resposta eficaz contra *L.amazonensis* (Suderkotter, 1993), e, caso as concentrações desta citocina sejam insuficientes pode até mesmo ocorrer um agravamento da infecção. Qi e colaboradores (2004) sugeriram que *L.amazonensis* possa ter desenvolvido algum mecanismo de escape, ainda desconhecido, contra a ativação macrofágica por IFN- $\gamma$ .

Foi também observado um aumento de IL-10 tanto nos linfonodos poplíteos quanto nos cervicais (Fig 2). Esta citocina pode estar desempenhando um papel regulador, proveniente de uma resposta gerada no sítio de mucosa nasal. Unger e Cols (2003) observaram que seguinte à imunização nasal foi gerado, tanto no linfonodo cervical quanto no linfonodo periférico, um aumento da produção inespecífica de IL-10. Sugere-se que a produção de IL-10 visaria à criação de um micro-ambiente adequado para controlar tanto o desenvolvimento de células T regulatórias quanto de T efectoras. Ainda não é conhecido o tipo celular envolvido no aumento da produção de IL-10 em questão.

O tempo de latência necessário para a produção de IFN- $\gamma$  após a imunização intranasal com LaAg pode ser ainda corroborado pelo fato de que os camundongos BALB/c imunizados com LaAg e infectados somente 4 meses após a administração da última dose da vacina foram capazes de controlar, de forma mais eficaz, a infecção e reduzir suas cargas parasitárias (Fig 4) em comparação aos camundongos infectados 1 semana após a última dose da vacina (Fig 1). Nós demonstramos que LaAg promove uma proteção duradoura contra *L.amazonensis*, e que esta proteção é acompanhada por um aumento significativo de IFN- $\gamma$  no linfonodo poplíteo (Fig. 5). A memória antígeno-específica foi comprovada pela resposta de hipersensibilidade tardia verificada após desafio com LaAg, 4 meses após a última imunização (Fig. 3).

Cabe ressaltar que neste caso o perfil de citocinas parece não ter sido decisivo para explicar o fenômeno observado, e que estudos adicionais devem ser realizados a fim de observar outros mecanismos que possam estar envolvidos. Pode-se, por exemplo, sugerir que a proteção esteja relacionada a uma população de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de perforina, que parecem ser os principais atores no processo de proteção conferida pela imunização com antígeno P-8 de membrana de amastigotas de *L. pifanoi*, por exemplo

(Colmenares *et al*, 2003). De fato, já foi demonstrado na literatura que células T citotóxicas de memória, que promovem uma memória específica e duradoura são geradas em sítios de mucosa (Gallichan & Rosenthal, 1998). Por outro lado, esta proteção parece ser independente da produção de IFN- $\gamma$  (Simons *et al*, 2001). Todavia, mais estudos neste sentido seriam necessários a fim de desvendar os mecanismos envolvidos.

Após termos verificado que a imunização pela via intranasal foi capaz de suscitar uma resposta imune protetora em um sítio periférico, decidiu-se estudar se o sítio de infecção poderia influenciar na eficácia da vacina. Neste caso, investigamos se uma infecção na orelha (sítio também drenado pelo linfonodo cervical, como a mucosa nasal) seria também controlada pela pré-imunização nasal. Em vez de proteção, o que se observou foi um aumento significativo da lesão, o que seria um indício de que o sítio de infecção influenciaria na proteção induzida por LaAg pela via intranasal. Foi verificado um aumento dos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ , no linfonodo drenante do sítio de imunização de animais imunizados, em relação ao controle não imunizado, enquanto houve uma redução das mesmas no sítio drenante da lesão. Aparentemente o efeito inflamatório de IFN- $\gamma$ , bem como seu efeito sobre o aumento da replicação de amastigotas, poderia estar levando ao aumento da lesão, bem como aumento do recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção. Por outro lado, a IL-10 poderia estar levando à desativação dos macrófagos infectados promovendo um cenário favorável para o agravamento da infecção. O papel deletério da IL-10 já foi demonstrado na infecção por *L.amazonensis* (Padigel *et al*, 2003). Também pôde ser verificada uma tendência ao aumento dos níveis de TGF- $\beta$  no linfonodo cervical, que já demonstrou seu papel deletério na imunização pela via intramuscular com LaAg (Pinheiro *et al*, 2005). Desta forma, podemos sugerir que o sítio de infecção parece ser importante na proteção conferida por antígenos administrados pela via intranasal.

Visando aprimorar a eficácia da vacinação intranasal, foram testados antígenos totais de outras espécies de *Leishmania sp*: LmAg, LdAg e LbAg. O antígeno com melhor eficácia em proteger contra infecção por *L.amazonensis*, foi, surpreendentemente, o antígeno total de *Leishmania donovani* (LdAg). Deste modo, a vacinação intranasal com este antígeno foi melhor estudada, visando verificar suas peculiaridades em relação à vacinação intranasal com LaAg. Primeiramente, verificou-se que este antígeno não foi capaz de elicitar uma resposta de hipersensibilidade de tipo tardia clássica, como LaAg (Fig. 9), sugerindo características próprias quando administrado pela via intranasal. Uma primeira rodada de verificação dos níveis de citocinas no linfonodo drenante da lesão demonstrou um significativo aumento dos níveis de TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  é reconhecidamente uma citocina relacionada à tolerância pelas vias de mucosa. Já foi reportado que células T regulatórias induzidas em sítios de mucosa são capazes de produzir TGF- $\beta$  (Unger *et al*, 2002). Conforme já mencionado, na introdução do presente trabalho, o TGF- $\beta$  constitui um fator de virulência na leishmaniose, promovendo a inativação de macrófagos e o crescimento de patógenos intracelulares, incluindo a *Leishmania* (Barral *et al*, 1993). *In vitro*, a adição de altas concentrações de IFN- $\gamma$  em cultura não foram capazes de reverter o efeito de TGF- $\beta$  em aumentar a infecção de macrófagos humanos por *L.braziliensis* (Barral *et al*, 1995). Além disso, esta citocina está implicada no efeito deletério da imunização intramuscular por LaAg (Pinheiro *et al* 2005). Por outro lado, foi recentemente descrita a importância de células T regulatórias no início da infecção por *L.amazonensis*. Células T regulatórias foram capazes de proteger transitoriamente camundongos infectados contra infecção por *L.amazonensis*, estando esta proteção correlacionada a redução da ativação de células T efetoras produtoras de IFN- $\gamma$ . A transferência adotiva de células T CD4+CD25+ singeneicas derivadas de lesão para camundongos C57BL/6 *naive*, antes da infecção,

reduziu significativamente o desenvolvimento da lesão nestes camundongos. Contudo, esta proteção é transitória, pois, aparentemente, após um determinado período, de aproximadamente 10 semanas, células efectoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> parecem ser favorecidas em termos de replicação em detrimento das células T regulatórias, que se replicam de forma mais lenta, dependente de IL-2. Nas lesões com 1 a 3 semanas são detectados altos níveis de transcritos de TGF- $\beta$ 1, FoxP3, IL-10RI, compatíveis com a presença de células T Reg (Ji *et al*, 2005).

A presença de níveis mais elevados de TGF-  $\beta$  no linfonodo poplíteo de camundongos imunizados com LdAg é compatível com a presença de células T regulatórias, contudo, devido ao reconhecido papel desativador de macrófagos desta citocina na leishmaniose tegumentar (Barral *et al*, 1995), pode-se inferir que outros fatores devem estar envolvidos. É provável que haja um balanço entre células T efectoras e células T Reg, para que possa haver uma proteção contra *L.amazonensis*. Sendo assim, sugerimos que deve haver alguma outra citocina, diferente de IFN- $\gamma$  que poderia estar desempenhando um papel de ativação e morte de parasitos. Há diversos relatos na literatura mostrando que o TNF- $\alpha$  é capaz de bloquear o efeito supressor de TGF- $\beta$  em macrófagos (Corradin *et al* 1993; Barral *et al* 1995). O papel do TNF- $\alpha$  na indução do mecanismo leishmanicida em macrófagos e na resistência a leishmaniose cutânea já está bem estabelecido (Titus *et al*, 1989; Theodos *et al*, 1991). Sendo assim os níveis desta citocina foram dosados no linfonodo poplíteo de camundongos imunizados. De fato, os níveis desta citocina encontravam-se aumentados, nos linfonodos poplíteos destes camundongos, sugerindo que ela tenha um papel decisivo na proteção observada. Surpreendentemente, os níveis de TNF- $\alpha$  também se encontravam elevados nos linfonodos cervicais, demonstrando ser a produção desta citocina comum tanto no sítio drenante da lesão quanto no sítio drenante da mucosa

imunizada. São necessários estudos adicionais com o LdAg a fim de se tentar determinar suas peculiaridades em relação ao LaAg que levam a proteção total contra a infecção por *L.amazonensis* e, se de fato, a proteção ocorre em diferentes sítios de infecção. De forma preliminar, o que se pode sugerir é que o balanço entre a produção da citocina imunossupressora e da efetora (independente de IFN- $\gamma$ ) seja fundamental na proteção observada neste modelo imunização nasal.

O efeito protetor observado na imunização i.n. com LaAg em camundongos BALB/c foi extensivo aos camundongos C57BL/6. Da mesma forma que observado com o LdAg protetor, o TNF- $\alpha$  está também relacionado com a proteção induzida em C57BL/6 por LaAg (Fig.12). O TNF- $\alpha$  parece portanto desempenhar um importante papel na imunização pela via intranasal.

## 6-Conclusões

1. O LaAg administrado pela via intranasal induziu resposta protetora e duradoura contra a infecção por *L.amazonensis* na pata de camundongos BALB/c.
2. A proteção pelo LaAg intranasal parece ser sítio-dependente, não tendo ocorrido quando a infecção foi na orelha. Mas este resultado precisa ser confirmado desafiando-se os animais em sítios diferentes de infecção.
3. O LdAg parece ser uma vacina potente para administração intranasal, promovendo redução drástica da lesão e da carga parasitária de *L.amazonensis* associada a um aumento de TNF- $\alpha$  nos linfonodos drenantes da vacina e da lesão.
4. A proteção causada pelo LaAg intranasal foi extensiva aos camundongos C57BL/6, que também estava associada a um aumento da produção de TNF- $\alpha$ .

**8- Referências Bibliográficas**

- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, H.A.; MCGACHY, A.N.; MCKENZIE, W.; CARTER, K.C. (2002). An essential role for IL-13 in maintaining a non healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur. J. immunol.* **32**:2923
- ALEXANDER, J; KAYE, P.M. (1985). Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin. Exp. Immunol.* **61**:674-682
- BARONE, K.S.; TOLAROVA, D.D.; ORMSBY, I.; DOETSCHMAN, T.; MICHAEL, J.G. (1998). Induction of oral tolerance in TGF- $\beta$ 1 null mice. *J. Immunol.* **161**: 154-160
- BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M; YOUNG, E.L.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. (1993). Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Immunology.* **90**: 3442-3446
- BARRAL, A.; TEIXEIRA, M; VINHAS, V. COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A.L.; REED, S.; CARVALHO, E.M., BARRAL-NETTO, M. (1995) Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* **147**: 947-954
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R., REED, S.G. (1992). Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* **257(5069)**: 545-548
- BELKAID Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. (2002). *Nature.* **420**:502-507
- BERMAN, J.D. (1988). Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Inf. Dis.* **10**: 560-586

- BLUESTONE, J.A.; TANG, Q. (2004). Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen specific regulatory T cells. *PNAS*. **101** (suppl.2): 14622-14626
- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin-10. *J. Exp. Med.* **174**: 1549-1555
- BOUVET, J; FISHETTI, V.A. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infec. Immun.* **67**: 2687-2691
- CHAN, M.M.Y. (1993). T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infections: Production of Interferon-g by CD8+ cells. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1181-1184
- COLMENARES, M.; KIMA, P.E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. (2003) Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell mediated responses in vaccine induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infec. Immun.* **71**:3172-3182
- CORRADIN, S.B.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y.; SMITH, J.; SUADERT, L.; MANUEL, J. (1993) Transforming growth factor beta 1 regulation of macrophage activation depends on triggering stimulus. *J. Leukoc Biol.* **54**: 423-429
- COURTNAY, O.; QUINNEL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian Dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of infectious diseases.* **186**:1314-1320.
- COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M. BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A.; DE LUCA, P. (1998). Immunologic patterns associated with cure in human american cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:139-142

- CSENCISITS, K.; JULITA, M.A.; PASCUAL, D.W. (1999). Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role addressin in naïve lymphocyte adhesion to high endothelial venules in mucosal site. *J. immunol.* **163**:1382-1389
- DAVIS, S.S. (2001). Nasal vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **51**: 21-42
- DE-LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; ALVES, C.R.; COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; BERTHO, A.L.; TOLEDO, V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; MENDONÇA, S.C. (1999). Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*,**17**: 1179-1185
- DE-LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; PINTO, J.A.; COUTINHO, S.G.; SANTIAGO, M.A., TOLEDO, V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; REIS, A.B.; MENDONÇA, S.C. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop.* **80**: 251-260
- FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**:2081-2095
- FUKUYAMA, S. (2002). Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTR $\beta$ R, and NIK signaling pathways but requires the *Id2* gene and CD3-CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells. *Immunity*.**17**:31-40
- GALLICHAN, W.S.; ROSENTHAL, K.L. (1996). Long lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J.Exp.Med.* **184**:1879-1890

- GALLICHAN, W.S.; ROSENTHAL, K.L. (1998). Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization. *J. Infec. Dis.* **9**: 2717-2726
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. *J. Immunol.* **148**: 1792-1796
- GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SHEIKY, Y.A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAM, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. (1993). Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infection. *J. Clin. Invest.* **92**: 324
- GICHERU, M.M.; OLOBO, J.O.; ANGILI, C.O. (1997). Heterologous protection by *Leishmania donovani* for *Leishmania major* infections in the vervet monkey model of the disease. *Exp. Parasitol.* **85**:109-116
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. (2003). Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* **36**:71-80
- GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B.; NACY, C.A. (1990). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotas by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* **144**: 278-283
- GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. (1996). Leishmaniasis. *J. Am. Acad.Dermatol.* **34**:257-272
- GUIMARAES, E.T.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.M.; DOS SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. (2006). Role of interelukin-4 and prostaglandin E(2) in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infec.* **In press.**

- HANDMANN, E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 229-243
- HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. (1993). Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.* **177**: 1505-1509
- HEPBURN, N.C.; SIDDIQUE, I.; HOWIE, A.F.; BECKETT, G.J.; HAYES, P.C. (1994). Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 453-455
- HERWALDT, B.L.(1999). Leishmaniasis. *The Lancet.* **354**:1191-1199
- HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS P.(1998). The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *J. immunol.* **177**: 6156-6163
- HIROI, T. (1998). Nasal immune system: distinctive Th0 and th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage respectively. *Eur. J. Immun.* **28**: 3346-3353
- HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.; JERONIMO, S; TEXEIRA, M.J.; SOUSA, A. DE A.; VASCONCELOS A.W.; PEARSON, R.D.; ABRAMS, J.S.; LOCKSLEY, R.M. (1993). Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *J. Clin. Invest.* **92**: 2626-2632
- HUFNAGL, K.; WINKLER, B.; FOCKE, M.; VALENTA, R.; SCHEINER, O.; RENZ, H.; WIEDERMANN, U. (2005). Intranasal tolerance induction with polypeptide derived from 3 noncross-reactive major aeroallergens prevents allergic polysensitization in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**: 370-376

- JAHNSEN, F.L.; GRAN, E.; HAYE, R.; BRANSTZAE, P. (2004). Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes. *Am. J. Resp. Cell mol. Biol.***30**: 31-37
- JAHNSEN, F.L.; LUND-JONHANSEN, F.; DUNNE, J.F.; FARKAS, L.; HAYE, R.; BRANDTZAEG, P. (2000). Experimentally Induced Recruitment of Plasmacytoid (CD123<sup>high</sup>) dendritic cells in human nasal allergy. *J. Immunol.***165**: 4062-4068
- JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.P.; BARRAL, A.; BITTENCOURT, A.; GRINALDI, A.; COSTA, J.M.L.; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W. (1987). Correlation of parasite species and clinical forms of cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio*,**82** (suppl), 57
- JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *New Engl. J. Med.*, **341**: 1795-1800
- JI, H.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. (2002). Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.***66**: 338-345
- JI, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. (2005). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immun.* **174**: 7147:7153
- JOHANSEN, P.; MEN, Y.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. (2000) Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**: 129-146
- JULIA, V.; RASSOLZADEGAN, M.; GLAICHENHAUS, N. (1996). Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science.***274**: 421-423

- KANE, M.M.; MOSSER, D. (2001). The role of IL-10 in promoting disease in leishmaniasis. *J. Immunol.* **166**: 1141-1147
- KAR, S.; METZ, C.; MCMAHON-PRATT. (2004). CD4+ T cells play a dominant role in protection against new world leishmaniasis induced by vaccination with the P-4 amastigote antigen. *Infect.Immun.* **73**: 3823-3827
- KELLINA, O.I.(1965) Changes in Virulence of strains of *Leishmania tropica major*. *Med. Parasitol.* **6**: 701-708
- KEMP, M.; HANDMAN, E.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; MUSTAFA, M.D.; KORDOFANI, A.Y.; BENDTZEN, K.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. (1998). The *Leishmania* promastigota surface antigen -2 (PSA-2) is specifically recognized by Th1 cells in human with naturally acquired immunity to *L.major*. *FEMS Immunol. Med. Microb.*, **20**: 209-218
- KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.L.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. (1999). T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **65**: 105-108
- KIYONO, H.; FUKUYAMA, S. (2004). NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews.* **4**: 699-709
- KURTZHALS, J.A.L.; HEY, A.S.; JARDIM, A.; KEMP, M.; SCHAEFER, K.U.; ODERA, E.O.; CHRISTENSEN, C.B.V.; GITHURE, J.I.; OLAFSON, R.W.; THENDER, T.G.; KHARAZMI, A. (1994). Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II. Absent or Th2-like response to gp 63 and Th1-like to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, **96**: 416-421

- LAINSON, R. (1983). The American leishmaniasis: some observations on their and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 569
- LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S.; SWIRHART, K.G.; XENARIUS, I.; ACHAORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R.M.; MACDONALD, H.R.; LOUIS, J.A. (1997). IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4 (+) T cells instructs the development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/C mice. *Immunity.* **6**: 541-549
- LI, J.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. (1998). Anti-TGF- $\beta$  treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J. Immunol.* **162**: 974-979
- LIMAYE, A.P.; ABRANS, J.S.; SILVER, J.E.; OTTESEN, E.A.; NUTMAN, T.B. (1990). Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased interleukin 5 production in helminth-infected patients. *J. Exp. Med.*, **172**: 399-402
- LIRA, R.; SUNDAR, S.; MAKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D. (1989). Evidence that high incidence of treatment failures in Indian Kala-azar is due to emergence of antimony-resistance strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* **180**: 564-567
- MAGGI, E.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; SIMONELLI, C.; PICCINI, M.P.; RUGIU, F.S.; CARLI, M.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. (1992). Reciprocal regulatory effects of IFN-g and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.*, **148**: 2142-2147
- MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MODABER, F. (1998). Phase I study of an inactivated vaccine

- against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**: 205-212
- MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous leishmaniases or the visceral disease. *Immunol. Rev.* **201**: 206-224
- MELBY, P.C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L.E.; CHENG, J. (2001). *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infec. Immun.* **69**: 4719-4725
- MESTECKY, J.; BLUMBERG, R.S. KIYONO, H.; MCGHEE, J.R. Fundamental Immunology. 5<sup>th</sup> Edition, Ch. 31 (ed. Paul, W.E.). *Academic, San Diego*,(2003). 965-1020
- MITCHELL, G.F.; (1983) Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with *Leishmania tropica major*. *J. Immunogenet.* **10**: 395-412
- MOORE, K.W.; WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. (2001). Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. immunol.* **19**: 683-765
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**: 1561-1577
- NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating Interleukin-10 production. *Infec. Immun.* **72**: 1240-1247
- O'HAGAN, D.T.; RAHMAN, D.; MCGHEE, J.P.; JEFFREY, H.; DAVIES, M.C.; WILLINAS, P.; DAVIS, S.S. (1991). Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. *Immunology.* **73**: 239-242

- OGRA, P.L. (2003). Mucosal Immunity: some historical perspectives on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines. *Immunology and Cell Biology*. **81**:23-33
- OGRA, P.L.; FADEN, H.; WELLIVER, R.C. (2001). Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clin. Microb. Rev.* **14**: 430-445
- OLOBO, J.O.; ANGILI, C.O.; GICHERU, M.M.; MBATI, P.A., KARIUKI, T.M.; GITHURE, J.L.; KOECH, D.K.; McMASTER, W.R. (1995). Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania major* surface glycoprotein (gp-63). *Vet. Parasitol.* **60**: 199-212
- PABST, R. (1992). Is BALB a major component of the human lung immune system? *Immunol. Today.* **13**:119-122
- PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P. (2003). The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J. Immun.* **171**: 3705-3710
- PEREZ-VICTORIA, F.J.; GAMARRO, F.; OUELLETTE, M.; CASTANSYS, S. (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol.Chem.* **278**: 49965-49971
- PINHEIRO, R.O.; PINTO, E.F; LOPES, J.R.; GUEDES, H.L.; ROSSI-BERGMANN, B. (2005). TGF- $\beta$  associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infec.* **7**:1317-1323.

- PINTO EF; DE MELLO CORTEZIA M; ROSSI-BERGMANN B. (2003). Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57 BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*.**21**:3534-3541
- PINTO. E.F. (2004). Eficácia das vias oral e nasal para administração de vacinas protéicas e de DNA na leishmaniose cutânea murina. *Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós -graduação em Ciências Biológicas.*
- Qi, J.; Ji, J.; WANASEN, N.; SOONG, L.; (2004) Enhanced Replication of *Leishmania amazonensis* amastigotas in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infec. Immun.***72**: 988-995
- RALPH, P.; NAKOINZ, I., SAMPSOM-JOHANES, A.; FONG, S.; LOWE, D.; MIN, H.Y.; LIN, L. (1992). IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.***148**: 808-814
- RIBEIRO-GOMES, F.L.; OTERO, A.C.; GOMES, N.A.; MONIZ-DE-SOUZA, M.C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A.C.; CALICH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOS REIS, G.A. (2004). Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* **172**: 4454-4462
- ROSSI-BERGMANN, B.; LENGLET, A.; BEZERRA-SANTOS, C.R.; COSTA-PINTO, D.; TRAUB-CZEKO, Y.M. (1999). Use of fluorescent *Leishmania* for faster quantitation of parasite growth *in vivo*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94 (Suppl. II)** :74
- ROUSE, B.T.; SUVAS, S. (2004). Regulatory Cells and infectious agents: Détentes cordiale and contraire. *J. Immunol.***173**:2211-2215

- SACKS, D.; TRAUTH, N.N. (2002). The Immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*.**2**: 845-858
- SATO, A.; HAYAKAMA, H; UCHIYAMA, H. (1996). Cellular distribution of bronchus-associated lymphoid tissue in rheumatoid arthritis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: 1903-1907
- SCOTT, P.; ARTIS, D.; UZONNA, J.; ZAPH, C. (2004). The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol. Rev.***201**:318-338
- SILVEIRA, F.T.; BLACKWELL, J.M.; ISHIKAWA, E.A.; BRAGA, R.R.; SHAW, J.J.; QUINNELL, R.J.; SOONG, L. KIMA, P.; MCMAHON-PRATT, D.; BLACK, G.F.; SHAW, M.A. (1998). T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol.***20**: 19-26
- SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBERT, C.E.P. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian Brazil – A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.***99**: 239-251
- SIMMONS, C.P.; HUSSEL, T., SPARER, T.; WALZI, G.; OPENSHAW, P.; DOUGAN, G. (2001). Mucosal delivery of respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cells responses. *J. Immunol.* **166**: 1106-1113
- SOONG, L.; CHANG, C.H.; SUN, J.; LONGLEY, B.J.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; MCMAHON-PRATT, D. (1997). Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.***158**: 5374-5383

- SOTO, J.; ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, J.C.; DIAS, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M; BERMAN, J.D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infec. Dis.* **38**: 1266-1272
- SUNDERKOTTER, C. (1993). Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **151**:4891-4901
- TABARA, K.S., PETERS, N.C.; AFRIN, F.; MENDEZ, S.; BERTHOLET, S.; BELKAID, Y.; SACKS, D.L. (2005). Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infec. Immun.* **73**:4714-4722
- THEODOS, C.D.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R.G. (1991). Role of Tumor Necrosis Factor in macrophage leishmanicidal activity *in vitro* and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Infect. Immun.*, **59**: 2839-2842
- THOMPSON, C.; POWERI, F. (2004). Regulatory T cells. *Current Opinion in Pharmacology*, **4**: 408-414
- TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. (1989). Tumor Necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, **170**:2097-2104
- TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTINI, J.C. & LOIUS, J.A. (1987). Involvement of specific Lyt 2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, **17**: 1429-1433
- TORRENTERA, F.A.; GLAICHENHAUS, N.; LAMAN, J.; CARLIER, Y. (2001). T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in

- determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. *Infec.Immun.* **69**: 617-621
- TRACY, J.W.; WEBSTER, Jr, L. T. (2003) The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 41. (ed. GILMAN, A.G.). MacGraw-Hill, . 1097-1120
- UNGER, W.W.J.; HAUET-BROERE, F.; JANSEN, W.; VAN BERKEL, L.A.; KRAAL, G.; SAMSOM, J.N. (2003). Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasal mucosa. *J.Immun.* **171**: 4592-4603
- UNGER, W.W.J.; JANSEN, W.; WOLVERS, A.W.; VAN HALTEREN, A.G.S.; KRAAL, G.; SAMSOM, J.N. (2002). Nasal tolerance induces antigen-specific CD4+CD25-regulatory T cells that can transfer their regulatory capacity to naïve cd4+ T cells. *Int. Immunol.* **15**: 731-739
- VALOUBBEECK, Y.F.; RAMER, A.E.; JIE, F.; JONES, D.E. (2004). *Infec. Immun.* **72**: 4455-4463
- WALTON, B.C. (1987). American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: The leishmaniasis in Biology and Medicine. (Peters W. and Killick-Kendric R.), Academic Press, London, 637-664
- WANG, Z.E.; REINER, S.L.; ZHENG, S.; DALTON, D.K.; LOCKSLEY, R.M. (1994). CD4+ effector cells default to Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **179**: 1367-1371
- YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, **254**: 277-279
- YOUNG, D.G.; ARIAS, J.R. (1991). Phlebotomine sandflies of Americas. Tech paper 33. Pan American Health Organization, Washington, D.C.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)