**GERSON SALAY** 

## IMUNIZAÇÃO GENÉTICA CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR Leishmania (Viannia) braziliensis

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2006

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

## **GERSON SALAY**

## IMUNIZAÇÃO GENÉTICA CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR Leishmania (Viannia) braziliensis

Orientador: Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues Co-orientadora: Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2006

## SALAY, Gerson

Imunização genética contra infecção experimental por *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis. Gerson Salay - São Paulo, 2006. 189p.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Salay, Gerson – Genetic immunization against experimental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

1. Imunização genética. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Imunidade Celular. 4. Antígenos parasitários.

Trabalho realizado na Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, e no Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com os auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais Marta e Pedro pelo empenho e dedicação constantes na minha formação acadêmica, e a todo amor e compreensão na minha vida pessoal, sem os quais não teria sido possível subir até hoje todos os degraus da vida; e aos meus irmãos Luiz Carlos e Edson por fazermos parte da família que nossos pais a construíram exemplarmente, formando um elo inseparável de amor e carinho entre nós.

The only way to discover the limits of possible is to go beyond them into the impossible.

Arthur C. Clark

#### AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues por ter me recebido em seu laboratório, e pela dedicação constante na minha formação científica.

À minha co-orientadora Dra. Clara Lucia Barbiéri Mestriner por todos os ensinamentos e auxílio dado à minha tese, e por toda a presteza que sempre me atendeu.

À Dra. Yasmine Belkaid (NIH) por ter me recebido em seu laboratório, e pelo enorme aprendizado adquirido durante o tempo ao seu lado.

À Dra. Miriam Leandro Dorta (UFGO) pela enorme contribuição nos vários experimentos realizados, sem a qual esta tese não teria o mesmo conteúdo.

Ao Dr. Renato Arruda Mortara por ter ajudado muito prontamente com as reações de imunofluorescência e microcopia ConFocal.

Ao Dr. Luis C. C. Afonso (UFOP) pela colaboração nos experimentos de imunização e desafio feito em seu laboratório, no momento em que não tínhamos o nosso modelo ainda.

À Dra. Camila I. de Oliveira e à Dra. Cláudia Brodskyn (UFBA) pelos parasitas cedidos para o desafio parasitário, o que foi de grande valia para a finalização da minha tese.

À Dra. Lucile L. M. Floeter-Winter (USP-SP) pelas intermináveis identificações moleculares dos parasitas utilizados, além de ter-nos cedido alguns deles.

A toda minha família e amigos que sempre me deram apoio e carinho durante esta jornada.

Aos animais de laboratório sem os quais esta tese não teria sido possível, peço aqui minhas desculpas por todo o sofrimento causado a vocês.

Àqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização do meu projeto de pesquisa, me auxiliando a dar um passo importante na área científica, incluindo aqueles que contribuíram me proporcionando experiências que farão parte do meu conhecimento e contínuo aprendizado como profissional e pessoa. Assim deixo aqui o meu muito obrigado a todos vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	XV
RESUMO	xviii
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais	2
1.2. A resposta imune nas leishmanioses	5
1.2.1. Durante infecção experimental	5
1.2.2. Em serem humanos	11
1.3. O desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose cutânea	13
1.3.1. Os antígenos candidatos à vacina contra leishmaniose cutânea	14
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Animais e parasitas	23
3.2. Composição das soluções e tampões utilizados	23
3.3. Meios de cultura	25
3.3.1. Meios para cultura de bactérias	25
3.3.2. Meio para cultura de células	26
3.3.3. Meios para cultura de linfócitos	26
3.3.4. Meio para cultura de parasitas	27
3.4. Manutenção dos parasitas <i>in vitro</i>	27
3.5. Manutenção dos parasitas <i>in vivo</i>	27
3.6. Obtenção de DNA genômico das espécies de Leihmania	28
3.7. Amplificação e purificação de genes das espécies de <i>Leishmania</i>	29
3.8. Clonagem dos genes amplificados das espécies de Leishmania no	
vetor genético pMOS	31
3.9. Transformação de bactérias com DNA plasmidial	31
3.9.1. Preparação de bactérias competentes	31

## SUMÁRIO

3.9.2. Transformação em bactérias competentes	32
3.9.2.1. Transformação de bactérias com plasmídios	32
3.9.2.2. Transformação de bactérias com produtos de ligação	32
3.10. Obtenção de DNA plasmidial	33
3.10.1. Pequena escala (método de lise alcalina)	33
3.10.2. Pequena escala (método "Boilling Prep")	34
3.10.3. Larga escala (método do gradiente de césio)	34
3.11. Marcação de sondas radioativas	36
3.12. Hibridação de DNA das colônias transformantes	37
3.13. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição e eletroforese	
em gel de agarose	38
3.14. Seqüenciamento dos clones recombinantes	38
3.15. Análise computacional das seqüências obtidas	40
3.16. Obtenção de formas amastigotas de L. (V.) braziliensis	40
3.17. Obtenção de RNA de formas promastigotas e amastigotas de Leishmania	41
3.18. Eletroforese de RNA	42
3.19. Transferência de RNA para filtros de náilon	43
3.20. Hibridação das membranas contendo os RNAs das diferentes formas	
de Leishmania	43
3.21. Subclonagem dos genes no vetor de expressão em células	
procarióticas pHIS	44
3.22. Expressão e purificação das proteínas recombinantes codificadas pelos	
plasmídios obtidos	45
3.22.1. Expressão das proteínas recombinantes	45
3.22.2. Purificação das proteínas recombinantes em coluna de afinidade	46
3.22.3. Purificação das proteínas recombinantes em gel SDS-PAGE	46
3.23. Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração ou transferência	
para filtros de nitrocelulose	47
3.24. Clonagem do epítopo reconhecido por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> em vetor	
para expressão em células procarióticas, pGEX-4T1	47

3.25. Expressão e purificação da proteína recombinante GST-EpLT 4	18
3.26. Subclonagem dos genes no vetor de expressão em células	
eucarióticas pcDNA3 <sup>2</sup>	19
3.27. Imunização com DNA recombinante	51
3.28. Imunização com proteína recombinante	52
3.29. Experimentos de imunolocalização através de reações de	
imunofluorescência indireta (IFI) e microscopia ConFocal	53
3.30. Ensaios de "Western blotting" para detecção de anticorpos	54
3.31. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos	55
3.31.1. ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG	55
3.31.2. ELISA para a detecção de subclasses de imunoglobulinas	56
3.32. Avaliação resposta imune celular, via produção de citocinas	56
3.32.1. Produção de IFN-γ	56
3.32.2. Produção de IL-10	58
3.33. Experimentos de infecção em animais de laboratório	58
3.33.1. Purificação de formas promastigotas metacíclicas	58
3.33.2. Infecção dos animais com formas promastigotas de <i>Leishmania</i> 5	;9
3.33.3. Obtenção de parasitas a partir de tecidos infectados	50
3.33.4. Quantificação de parasitas a partir de tecidos infectados	51
3.34. Citometria de fluxo para marcadores de superfície celular a partir dos	
tecidos infectados	51
3.35. Obtenção e infecção de células dendríticas derivadas de medula	
óssea	52
3.36. Citometria de fluxo para marcadores de citocinas intracelulares	52
3.37. Produção e Purificação de anticorpos monoclonais	53
3.38. Tratamento de animais com anticorpos monoclonais	54
3.39. Dosagem de citocina produzida por células de LN de drenagem	54
3.40. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	55
4.1. Identificação e caracterização de genes de L. (V.) braziliensis	56

4.1.1. A sequência de DNA	66
4.2. Análise da expressão destes antígenos nas diferentes formas do	
parasita	73
4.2.1. Os transcritos de mRNA	73
4.2.2. A expressão protéica	75
4.3. Resposta imune induzida pela imunização utilizando-se antígenos de	
L. (V.) braziliensis	82
4.3.1. A resposta imune humoral induzida	83
4.3.2. A resposta imune celular induzida	89
4.4. Padronização de um modelo de infecção para L. (V.) braziliensis em	
camundongos isogênicos	97
4.5. Avaliação de resposta imune protetora induzida pela imunização com	
antígenos de L. (V.) braziliensis	102
4.6. Modulação da resposta imune usando anticorpos que reagem com	
células reguladoras	110
5. DISCUSSÃO	120
6. CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	141
APÊNDICES	149
APÊNDICE 1 – Trabalho Publicado	150
APÊNDICE 2 – Trabalho Publicado	177

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME	-	2-mercaptoetanol				
P	-	Fósforo 32 radioativo				
°C	-	Graus Celsius				
A	-	Adversaria Converte de Encord				
ACF	-	Adjuvante Completo de Freund				
AIF	-	Adjuvante Incompleto de Freund				
ALUM	-	Adjuvante de Hidróxido de Alumínio				
AMP	-	Ampicilina				
APC	-	Célula Apresentadora de Antígeno				
BSA	-	Albumina Sérica Bovina				
CaCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Cálcio				
cDNA	-	Deoxirribonucleotídeo Complementar				
Ci	-	Curie (1 ci= $3,7 \times 10^{10}$ desintegrações/minuto)				
CL	-	Leishmaniose Cutânea				
cm	-	Centímetro				
cpb	-	Cisteína Proteinase b				
CpG ODN	-	Motivos de oligodeoxinucleotídeos de citosina e guanidina				
CsCl	-	Cloreto de Césio				
cpm	-	Contagem por minuto				
CTLA-4	-	"Cytotoxic T lymphocyte Associated Antigen 4"				
DAB	-	Diaminobenzidina				
DC	-	Célula Dendrítica				
DTT	-	Dithiothreitol				
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico				
DNase	-	Desoxirribonuclease				
dNTP	-	Deoxi-nucleotídios				
DO	-	Densidade Óptica				
DP	-	Desvio Padrão				
DTH	-	"Delayed Type Hipersensibility" – Hipersensibilidade do Tipo Tardia				
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetracético				
ELISA	-	"Enzyme-linked Immunosorbent Assay"				
EpLT	-	Epítopo para Linfócito T				
e.v.	-	Endovenoso				
FACS	-	"Fluorescence Activated Cell Sorter"-Separação Celular Ativada por Fluorescência				
FB	-	"Frozen Buffer" – Tampão de Congelamento				
FC Block	-	Solução de Sobrenadante de Cultura Celular de Linhagem 24G2, Receptor Fcy III/II				
g	-	Gravidade				
GITR	-	"Glucocorticoid-induced TNF family-related receptor"				
gp46	-	Glicoproteína de 46 KDa				
gp63	-	Glicoproteína de 63 KDa				
GM-CSF	-	"Granulocyte Macrophage Costimulatory Stimulator Factor"				
GST	-	Glutationa-s-transferase				
$H_2CO_3$	-	Ácido Carbônico				
$H_2O_2$	-	Água Oxigenada				
$H_2SO_4$	-	Ácido Sulfúrico				
HCl	-	Ácido clorídrico				
HEPES	-	Ácido n-2-hidroxietilpiperazina n-2-etanosulfônico				
Ig	-	Imunoglobulina				
IgSP	-	Peptídeo Sinal de Imunoglobulina				
IĽ	-	Interleucina				
IL-12 p40	-	Interleucina-12 subunidade de 40 KDa				
-						

IL-12 p70	-	Interleucina-12 subunidade de 70 KDa			
i.d.	-	Intradérmico			
i.m.	-	Intramuscular			
INF-γ	-	Interferon – gama			
IPTG	-	Isopropil-β-d-tiogalactopiranosídio			
i.v.	-	Intravenoso			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	Fosfato de Potássio Bibásico			
kb	-	Ouilo Pares de Bases			
KCl	-	Cloreto de Potássio			
kDa	-	Ouilo Dalton			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Fosfato de Potássio Monobásico			
KHCO <sub>3</sub>	-	Bicarbonato de Potássio			
KO	-	"Knockout"			
L	-	Litro			
LACK	-	Proteína C guinase ativada de <i>Leishmania</i>			
LB	-	Meio Luria-Bertani			
LbSTI1	-	Proteína 1 de Estresse Induzível de <i>Leishmania braziliensis</i>			
LeIF	-	Fator Ribossomal de Iniciação e Elongação de <i>Leishmania</i>			
LiCl	-	Cloreto de Lítio			
M	-	Molar			
mA	-	Miliampère			
uCi	-	Microcurie			
MCL	-	Leishmaniose Mucocutânea			
M_CSF	_	"Macronhage Costimulatory Stimulator Factor"			
ma	_	Miliorama			
ing	-	Milgrania			
μg MIE	-	"Migration Inhibitory Factor" Eator Inibitário de Migração			
MIF	-	Migration minorory racior – rator mionorio de Migração			
μΜ	-	Micromotal			
μm	-	Micrometro			
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Magnésio			
MgSO <sub>4</sub>	-	Sulfato de Magnésio			
MHC	-	Complexo Maior de Histocompatibilidade			
mL	-	Millitro			
μL	-	Microlitro			
mJ	-	Milijoules			
mM	-	Milimolar			
mm	-	Milímetro			
MOPS	-	Acido 3-(N-morfolino)			
MPL-SE	-	"Monophosphoryl Lipid A plus Squalene"			
N	-	Normal			
NNN	-	Meio Novy-MacNeal-Nicolle			
$Na_2CO_3$	-	Carbonato de Sódio			
$Na_2HPO_4$	-	Fosfato de Sódio Bibásico			
$Na_2PO_4$	-	Fostato de Sódio			
NaCl	-	Cloreto de Sódio			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Fostato de Sódio Monobásico			
NaHPO <sub>4</sub>	-	Fostato de Sõdio Monobásico Anidro			
NaHCO <sub>3</sub>	-	Bicarbonato de Sódio			
NaNO <sub>2</sub>	-	Nitrato de Sódio			
NaOH	-	Hidroxido de Sódio			
ng	-	Nanograma			
NH <sub>4</sub> Cl	-	Cloreto de Amônio			
N1	-	Niquel			

NK	-	Células "Natural Killer"			
nM	-	Nanomol			
NO	-	Óxido Nítrico			
NOS2	-	NO sintase 2			
OPD	-	Ortofenilenodiamina			
Р	-	Probabilidade			
PAGE	-	letroforese em Gel de Poliacrilamida			
PAMPs	_	Pathogen Associated Molecular Patterns"			
nb	_	arres de Bases			
ng	-	Picograma			
nH	-	Ponto Hidrogeniônico			
PBMC	_	"Perinheral Blood Mononuclear Cells"			
PRS	_	Solução Salina Tamponada com Fosfato			
PBS-T20	_	PBS Tween 20			
PCR	_	"Polimerization Chain Reaction" – Reação de Polimerização em Cadeia			
DEC	-	Poliatilanoglicol			
reo	-	Diagonal			
DMSE	-	Picoliloi Eluorota da Fanilmatil gulfanila			
PIVISF	-	Fluoreto de Fellimetil-sufforma			
psi	-	pounds per square inch – libras por polegada quadrada			
q.s.p.	-	Quantidade Suficiente Para			
RAPD	-	"Randomly Amplified Polymortic DNA"			
rlL	-	Interleucina recombinante			
RNA	-	Acido Ribonucléico			
RNase	-	Ribonuclease			
rpm	-	Rotações por Minuto			
S.C.	-	Subcutâneo			
SDS	-	Dodecil Sulfato de Sódio			
SFB	-	Soro Fetal Bovino			
SLA	-	"Soluble Leishmanial Antigen" – Antígeno Solúvel de Leishmania			
SN-L 929	-	Sobrenadante de Meio de Cultura de Células L-929			
SSC	-	Citrato de Sódio			
STET	-	Solução de Sacarose-Tris-EDTA-Triton			
TAE	-	Tampão Tris-acetato-EDTA			
Taq	-	Termophilus aquaticus			
TBE	-	tampão tris-borato-EDTA			
TCR	-	"T-Cell Receptor" – Recpetor de Célula T			
TE	-	Tampão tris-ÊDTA			
Tef	-	Células T Efetoras			
TELT	-	Solução de Tris-EDTA-Lítio-Triton			
TEMED	-	N. n. n'. n' tetrametil etilenodiamida			
TGF-B	_	"Tumor Growth Factor – beta"			
T <sub>u</sub> 1	_	Thelper 1			
$T_{\rm H}^{\rm H}$	_	Thelper 7			
TNF	_	"Tumor Necrosis Factor" – Fator de Necrose Tumoral			
Trea	_	Células T Reguladoras			
Tris	_	(Hidroximetil) – aminometano			
tPNA	-	(IndioAnneth) – annionetano RNA Transportador			
	-	Proteína Antiovidante Tiel Específico			
ISA	-	Unidada			
U V	-	Unitate Volt			
v VI	-	vuit Laichmaniaga Viscoral			
VL Val/mal	-				
V OI/VOI	-				
X-gal	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-d-galactopiranosidio			
WHO	-	"World Health Organization" – Organização Mundial da Saúde			

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Espécies de Leishmania associadas a doenças	
humanas	2
TABELA 2 - Sequências oligonucleotídicas utilizadas para amplificação	
dos genes clonados de Leishmania (Viannia) braziliensis	30
TABELA 3 - Número de acesso no Banco de Genes dos genes clonados	
de L. (V.) braziliensis, a partir das sequências depositadas da espécie L.	
(L.) major, com exceção do gene leif, como indicado	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo evolutivo de parasitas do gênero Leishmania, mostrando as formas	
promastigotas extracelulares existentes no hospedeiro invertebrado e as formas	
amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado	4
<b>Figura 2:</b> Modelo de desenvolvimento de resposta T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 após infecção cutânea	
com formas promastigotas de L. (L.) major	6
Figura 3: Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências de	
aminoácidos preditas do gene lack clonado a partir de DNA genômico de L. (V.)	
braziliensis	68
Figura 4: Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências de	
aminoácidos preditas do gene tsa clonado a partir de DNA genômico de L. (V.)	
braziliensis	69
Figura 5: Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências de	
aminoácidos preditas do gene <i>lbsti1</i> clonado a partir de DNA genômico de L. (V.)	
braziliensis	71
Figura 6: Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências de	
aminoácidos preditas do gene <i>leif</i> clonado a partir de DNA genômico de L. (V.)	
braziliensis	72
Figura 7: Análise por "Northern-Blot" da transcrição de mRNA dos genes por nós	
clonados de L. (V.) braziliensis, em ambas as formas parasitárias	74
Figura 8: Eletroforese em gel SDS-PAGE das proteínas recombinantes expressas	
e purificadas, referentes aos genes por nós clonados de L. (V.) braziliensis	77
Figura 9: Ensaio de imunofluorescência indireta de formas promastigotas de <i>L</i> .	
(V.)braziliensis	79
Figura 10: Reação de imunofluorescência indireta com macrófagos de medula	
óssea de camundongos BALB/c, infectados com L. (V.) braziliensis	81
Figura 11: "Western Blotting" de reconhecimento das proteínas recombinantes	
processadas (His-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1) por soro de animais	
imunizados com os respectivos plasmídios	84
Figura 12: Elisa para detecção de anticorpos IgG, e suas subclasses, a partir do	
soro de animais imunizados com os respectivos plasmídios na formulação de DNA	

recombinante	86	
Figura 13: Elisa para detecção de anticorpos IgG, e suas subclasses, a partir do		
soro de animais imunizados com os respectivos antígenos na formulação de		
proteínas recombinantes		
Figura 14: ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de		
células de baço de camundongos imunizados	90	
Figura 15: ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de		
células de baço de camundongos imunizados, concomitante à inibição por		
anticorpos monoclonais	92	
Figura 16: ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de		
células de baço de camundongos imunizados com os antígenos em conjunto ou em		
separado, na formulação de DNA recombinante	94	
Figura 17: ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de		
células de baço de camundongos imunizados com os antígenos em conjunto ou em		
separado, na formulação de proteína recombinante		
Figura 18: Fotografía de lesão de orelha de camundongos BALB/c após 7		
semanas de infecção com formas promastigotas metacíclicas purificadas de L. (V.)		
braziliensis	99	
Figura 19: Citometria de fluxo de tecido dérmico infectado com L. (V.)		
braziliensis		
Figura 20: Curso de infecção de hamsters Golden imunizados com os respectivos		
plasmídios representados na figura, seguidos de infecção por L. (V.) braziliensis	103	
Figura 21: Curso de infecção de camundongos C57BL/6 imunizados com os		
respectivos plasmídios representados na figura, seguidos de infecção por L. (V.)		
braziliensis	105	
Figura 22: Curso de infecção de camundongos BALB/c imunizados com os		
respectivos plasmídios, seguidos de infecção por L. (V.) braziliensis, e		
quantificação parasitária nos sítios de infecção e drenante	107	
Figura 23: Curso de infecção de camundongos BALB/c imunizados com os		
respectivos antígenos na formulação de DNA e proteína recombinantes, seguido de		
infecção por L. (V.) braziliensis	109	
Figura 24: Curso de infecção de camundongos nocautes e selvagens para a		

L

molécula GITR, infectados por L. (L.) major	111
<b>Figura 25:</b> Citometria de fluxo e ELISA para IFN-γ, dos camundongos nocautes e	
selvagens para GITR infectados com L. (L.) major	113
Figura 26: Citometria de fluxo para expressão da molécula GITR em	
camundongos C57BL/6 infectados com L. (L.) major	114
<b>Figura 27:</b> ELISA para IFN-γ e IL-10 por células de órgãos linfóides de	
camundongos C57BL/6 infectados com L. (L.) major e tratados com anticorpo	
anti-GITR	116
Figura 28: Curso de infecção de camundongos C57BL/6 infectados com L. (L.)	
<i>major</i> , e tratados com anticorpo anti-GITR ou isotipo	117
Figura 29: Quantificação parasitária em diferentes sítios de camundongos	
C57BL/6 infectados com L. (L.) major e tratados com anticorpo anti-GITR ou	
isotipo controle	118
<b>Figura 30:</b> ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ em sobrenadante de cultura	
de camundongos C57BL/6 infectados com L. (L.) major e tratados com anticorpo	
anti-GITR ou isotipo controle	119

#### **RESUMO**

A Leishmania (Viannia) braziliensis é o agente etiológico de mais de 90% dos casos de leishmanioses cutânea e mucocutânea no Brasil. Apesar da alta fregüência no Brasil, poucos estudos de vacinação estão descritos utilizando esta espécie de Leishmania. Com intuito de iniciar os estudos de vacinação experimental contra as leishmanioses cutânea e mucocutânea causada por L. (V.) braziliensis, isolamos os genes que codificam os antígenos LACK, TSA, LeIF e LbSTI1 desta espécie. Os genes foram caracterizados segundo sua següência de DNA e transcrição de mRNA nas diferentes formas do parasita. Observamos alta conservação na següência predita de aminoácidos quando comparamos as espécies L. (V.) braziliensis e L. (L.) major com identidades de 83% a 96%. Observamos também a presença de mRNA tanto nas formas promastigotas como amastigotas de L. (V.) braziliensis. Em seguida, inserimos estes genes em vetores para expressão em células eucarióticas e procarióticas. As proteínas recombinantes bacterianas foram inicialmente utilizadas para imunização de camundongos. Os anticorpos específicos foram utilizados para confirmar a expressão destes antígenos nas formas promastigotas e amastigotas de L. (V.) braziliensis. Posteriormente, observamos que a imunização de camundongos com plasmídios e proteínas recombinantes dos respectivos antígenos, induziu a produção de anticorpos específicos, com diferenças na magnitude e tipos de subclasse de anticorpo, assim como linfócitos produtores de IFN-y. Por fim, analisamos a imunidade protetora após o desafio com formas promastigotas de L. (V.) braziliensis. Observamos que a resposta imune desencadeada pela imunização não foi suficiente para reduzir a lesão primária da infecção experimental.

Desta parte de nossos estudos concluímos que: i) os quatro antígenos por nós clonados de *L. (V.) braziliensis* possuem potencial para utilização em estratégias de imunização contra infecção experimental por parasitas do gênero *Leishmania*; ii) as diferentes estratégias de imunização utilizadas não foram capazes de induzir significativa imunidade contra a infecção experimental com *L. (V.) braziliensis*.

Em paralelo, estudamos o papel da molécula "glucocorticoid-induced tumor necrosis factor family-related receptor" (GITR) durante a infecção experimental com *L. (L.) major.* Inicialmente, observamos que camundongos geneticamente deficientes que não expressam a molécula GITR foram mais resistentes à infecção, quando comparados ao grupo de animais selvagens. Este aumento na resistência correlacionou com o aumento no número de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  presente no sítio de infecção. Complementamos estes experimentos, estudando o efeito do tratamento com anticorpos anti-GITR nesta infecção. Observamos que o tratamento com este anticorpo levou a diminuição do número de parasitas no sítio da lesão quando comparado ao grupo controle de animais. Este fenômeno foi correlacionado com a quantidade de IFN- $\gamma$  produzida por células do linfonodo de drenagem. Destes experimentos pudemos concluir que a molécula GITR tem um papel crítico durante a leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) major*, e que anticorpos anti-GITR tem um potencial para serem utilizados em estratégias de vacinação contra a leishmaniose cutânea potencializando a resposta imune específica.

#### ABSTRACT

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is responsible for more than 90% of the cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Brazil. In spite of the high frequency of this parasite in Brazil, few studies of vaccination using this species of Leishmania are described. Aiming at initiating these studies of experimental vaccination against cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis caused by L. (V.) braziliensis, we isolated the genes encoding the antigens LACK, TSA, LeIF e LbSTI1. The genes were characterized according to their DNA sequence and mRNA transcription in the different forms of the parasite. We observed a high conservation in the predicted amino acid sequences when we compared the species L. (V.) braziliensis and L. (L.) major. The identities varied from 83% to 96%. We also observed the presence of mRNA in both forms of L. (V.) braziliensis (promastigotes and amastigotes). Subsequently, we cloned these genes into vectors which allowed their expression into eukaryotic or prokaryotic cells. The bacterial recombinant proteins were initially used to immunize mice. Specific antibodies were used to confirm the expression of these antigens in promastigotes and amastigotes of L. (V.) braziliensis. Subsequently, we observed that the immunization of mice with recombinant plasmids and recombinant proteins representing the distinct antigens induced specific antibodies and IFN- $\gamma$  producing T cells. Finally, we evaluated the degree of protective immunity after a challenge with promastigotes forms of L. (V.) braziliensis. We observed that the immune response induced by immunization was not sufficient to reduce the primary lesion caused by infection.

From these results we concluded that: i) all four antigens isolated from *L. (V.)* braziliensis have the potential to be used for immunization against experimental infection by different species of *Leishmania*; ii) the different strategies of immunization used were not capable of inducing significant immunity to experimental infection with *L. (V.)* braziliensis.

In parallel, we studied the role of the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein (GITR) during infection with *L. (L.) major*.

Initially, we observed that genetically deficient mice which do not express GITR were more resistant to infection when compared to wild type animals. The resistance correlated with the increased number of IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T cells in the infection site. We complemented these experiments, studying the effect of the treatment with antibodies to GITR during infection. We observed that treatment with these antibodies led to reduction in the number of parasites in the lesion site when compared to control animals. The reduction was correlated with the amount of IFN- $\gamma$  produced by lymph node cells. From these experiments we concluded that GITR has a critical role during cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L.)* major and that antibodies to GITR may have a potential to be used for vaccination against cutaneous leishmaniasis improving the specific immune response.

1. Introdução

### **1.1.** Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* que no homem se manifestam sob 4 diferentes formas clínicas: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. O desenvolvimento dessas formas está na dependência da espécie do parasita, da carga genética do hospedeiro humano, e da resposta imune adquirida durante a infecção.

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, estando divididas em 2 sub-gêneros (*Leishmania* e *Viannia*) e 4 complexos (Tabela 1).

Forma da		Espécies no		Espécies no
Forma da		Especies no		Especies no
doença		Novo Mundo		Velho Mundo
	Complexo	L.(L.) mexicana	Classificadas	L. (L.) major
	Leishmania	L. (L.) amazonensis	fora do	L. (L.) tropica
	(Leishmania)	L. (L.) pifanoi	complexo L.	L. (L.)
Cutânea	mexicana	L. (L.) venezuelensis	(L.) donovani	aethiopica
	Complexo	L. (V.) braziliensis		
	Leishmania	L. (V.) panamensis		
	(Viannia)	L. (V.) guyanensis		
	braziliensis	L. (V.) peruviana		
Cutânea		L. (L.) amazonensis		L. (L.)
difusa		L. (L.) pifanoi		aethiopica
Mucocutânea		L. (V.) braziliensis		
	Complexo			L. (L.) infantum
Visceral	Leishmania (L.)	L. (L.) chagasi		L. (L.) donovani
	donovani			

Tabela 1: Espécies de Leishmania associadas a doenças humanas.

Adaptado de Lainson & Shaw, 1987.

No mundo a doença acomete 88 países, concentrando-se nas regiões tropicais e sub-tropicais do planeta. Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, 12 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que 350 milhões vivem sob o risco da doença, surgindo anualmente cerca de 2 milhões de novos casos (WHO, 2002).

Cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria; 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Peru e Bolívia; e 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (revisado por Brodskyn *et al*, 2003). Desta forma fica evidente que o Brasil é o principal país endêmico das leishmanioses, sejam cutânea, mucocutânea ou visceral.

A doença é transmitida pela picada das fêmeas infectadas de insetos dípteros da subfamília Phlebotominae, sendo no Velho Mundo representados pelo gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo pelo gênero *Lutzomyia*. Cerca de 20 espécies de flebotomíneos já foram incriminadas como transmissoras da doença ao homem, resultando em ampla distribuição geográfica deste vetor biológico. A infecção se dá durante o repasto sanguíneo das fêmeas, e a saliva do inseto desempenha um papel relevante na infecção.

O ciclo evolutivo de *Leishmania* está representado na figura 1 e inclui as formas promastigotas (a), alongadas, flageladas e móveis, que são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado e fagocitadas por macrófagos (b). No interior do vacúolo parasitóforo, o parasita se diferencia em amastigota, forma arredondada e aflagelada. Após a multiplicação por divisão binária os amastigotas rompem o macrófago, são liberados do meio intracelular e novamente fagocitados por outros macrófagos (c). Durante o repasto sangüíneo a fêmea do flebotomíneo ingere os macrófagos infectados com as formas amastigotas (d) que ao longo do tubo digestivo do vetor se diferenciam em promastigotas. Os promastigotas multiplicam-se e migram para a probóscida do inseto, diferenciam-se em formas infectivas metacíclicas (e) que são inoculadas no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva durante a picada, reiniciando o ciclo.



**Figura 1**: Ciclo evolutivo de parasitas do gênero *Leishmania*, mostrando as formas promastigotas extracelulares existentes no hospedeiro invertebrado e as formas amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado. VL, leishmaniose visceral; e CL, leishmaniose cutânea. Figura retirada do site <u>http://www.who.int/tdr/diseases/</u>.

As leishmanioses representam zoonoses e os seus principais reservatórios são animais silvestres, incluindo pequenos roedores, que vivem na região de mata e floresta. Ocorrem também em áreas rurais onde os animais domésticos, como cães e gatos, e alguns de importância econômica, como cavalos, constituem os reservatórios. Os hamsters parecem também representar reservatórios de *Leishmania* e esses roedores são freqüentemente utilizados como modelos experimentais de estudos de imunologia das leishmanioses (Sinagra *et al.*, 1997; e Travi *et al.*, 2002). Vale ressaltar que o cão representa um importante reservatório, principalmente de leishmaniose visceral, o desenvolvimento de vacinas para esses animais tem sido um importante alvo de pesquisa (Mayrink *et al.*, 1989; e Pinheiro *et al.*, 2005).

### 1.2. A resposta imune nas leishmanioses.

#### 1.2.1. Durante a infecção experimental.

A primeira postulação do modelo  $T_H1$  e  $T_H2$  nas respostas imunes em leishmaniose cutânea foi realizada em camundongos infectados com *L. (L.) major*. Em alguns modelos murinos isogênicos tem se estabelecido o perfil de resistência e suscetibilidade à *Leishmania*. Camundongos BALB/c não controlam a infecção por *L. (L.) major* e desenvolvem lesões progressivas, gerando uma patologia sistêmica. Essa linhagem serviu de base para as formas da leishmaniose humana que não se curam espontaneamente, como a forma cutânea difusa. Por outro lado, camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção por *L. (L.) major*, mimetizando assim a forma cutânea de cura espontânea em seres humanos. A suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major* em camundongos correlaciona-se à predominância de uma resposta  $T_H2$  com produção de IL-4 e IL-10, enquanto que a resistência é condicionada ao predomínio de resposta  $T_H1$  com produção de IFN- $\gamma$  (revisado por Sacks & Noben-Trauth, 2002). A figura 2 representa a resposta de camundongos à infecção por *L. (L.) major* que pode culminar em resposta  $T_H1$  (a) ou  $T_H2$  (b).



**Figura 2:** Modelo de desenvolvimento de resposta  $T_H 1/T_H 2$  após infecção cutânea com formas promastigotas de *L. (L.) major*. Em (a) desenvolvimento de resposta de perfil  $T_H 1$ , em (b) desenvolvimento de resposta de perfil  $T_H 2$  (retirado de Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Nesse modelo enfoca-se a diferenciação de linfócitos com perfis  $T_H1$  e  $T_H2$  a partir da apresentação de antígenos parasitários à células T CD4<sup>+</sup> "naive". A interação de moléculas co-estimuladoras com seus respectivos ligantes (CD40-CD40L, OX40-OX40L e/ou CD80-CD86/CD28), assim como o ambiente local de citocinas, induzem a diferenciação dessas células "naive" em linfócitos  $T_H1$  secretores de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , ou células  $T_H2$  secretoras de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, entre outras. Também

tem sido proposto que existem distintas subpopulações de células dendríticas (DC1 e DC2) que por sua vez direcionam as vias de diferenciação  $T_H1/T_H2$ . Em (a) o desenvolvimento da resposta  $T_H1$  se dá pela resposta de células apresentadoras de antígenos a moléculas parasitárias conhecidas como PAMPs, que determinam a secreção de IL-12 e a diferenciação das células "naive" em células produtoras de IFN- $\gamma$ . Sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT-4 e STAT-1) são ativados por IL-12 e IFN- $\gamma$ , respectivamente. O fator T-bet é um fator transcricional específico de linhagens  $T_H1$ . Em (b) a falta de habilidade de antígenos ativarem células dendríticas a produzirem IL-12 leva à diferenciação das células "naive" em linfócitos  $T_H2$ . Antígenos ou ambientes específicos no tecido devem ativar as células dendríticas a produzirem IL-4 ou IL-10 que irão determinar o desenvolvimento de células  $T_H2$ . O fator STAT-6 é ativado pela ligação ao receptor de IL-4 e o fator transcricional GATA-3, específico de linhagem de células  $T_H2$ , que liga-se a receptores do GATA (AGATAG). Essa série de eventos resulta na produção de citocinas típicas de padrão de linfócitos  $T_H2$ .

De forma geral, a imunidade protetora contra a leishmaniose está associada com a imunidade clássica mediada por células, enquanto a suscetibilidade está associada com uma forte resposta humoral, e uma fraca ou ausente resposta celular. Os parasitas têm a capacidade de escapar da resposta imune, interferindo na capacidade microbicida dos macrófagos hospedeiros, além de serem capazes de subverter a indução de ambas respostas imunes, inata e adquirida. Estudos sugerem que o fenótipo suscetível, com a geração de células de perfil T<sub>H</sub>2 não é derivado do fenômeno de produção precoce de IL-4 em resposta a antígenos parasitários, mas sim da falha em produzir ou responder a IL-12 (revisado por McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Considerando o ambiente de citocinas gerado durante a resposta imune, a IL-12 parece ser primordial no desencadeamento do fenótipo resistente em camundongos. A ausência de IL-12, obtidas por meio de técnicas genéticas ou de neutralização por anticorpos, mostra que camundongos resistentes adquirem um fenótipo suscetível, nestes ensaios, enquanto animais suscetíveis quando tratados com IL-12 desenvolvem um fenótipo resistente à infecção por *L. (L.) major*. Outras citocinas também contribuem para esse fenótipo, como a IL-1 $\alpha$ , MIF, interferons tipo 1, IL-18 e TNF, além de homólogos funcionais e estruturais da IL-12, como a IL-27 (revisado por Scott *et al.*, 2004). No ambiente da resposta imune inata, a IL-12 produzida principalmente por células dendríticas e ás vezes com o auxílio da IL-18, ativa células NK a produzirem IFN- $\gamma$  que influencia não somente esta resposta, mas também a resposta T<sub>H</sub>1. O IFN- $\gamma$  medeia a proteção induzindo a expressão de NOS2 e produção de NO pelos macrófagos.

A IL-10 produzida por células de perfil T<sub>H</sub>2 está intimamente relacionada à suscetibilidade. Em experimentos com camundongos BALB/c suscetíveis à infecção por L. (L.) major foi demonstrado que animais deficientes em IL-10 foram capazes de controlar a doença, desenvolvendo lesões relativamente pequenas. Quando foi estudado o mecanismo de resposta de macrófagos à infecção por L. (L.) major in vitro, observou-se que os amastigotas opsonizados por IgG murino foram fagocitados pelos macrófagos via receptor Fcy com produção de grandes quantidades de IL-10, indicando que a sobrevivência e multiplicação dos amastigotas seriam facilitadas pela desativação dos mecanismos microbicidas do macrófago sob o efeito da IL-10 (Kane & Mosser, 2001). Outros trabalhos também mostram que a persistência de parasitas no sítio de infecção está associada à presença de IL-10 no local, e que animais deficientes para IL-10, ou duplo deficientes para IL-4 e IL-10, foram capazes de ativarem cura estéril no sítio infectado. Até mesmo o uso de anticorpos neutralizantes anti-receptor de IL-10, durante a fase crônica da doença, em modelos resistentes, induziu a cura estéril mostrando que a ausência de resposta a esta citocina gerou este caráter de resistência (Belkaid et al., 2001).

O conceito de que a produção de IL-4 precoce em camundongos BALB/c gera o fenótipo suscetível ainda é motivo de discussão. Há várias situações onde esta produção precoce da citocina não conduz para uma resposta  $T_H2$  estável, ou seja, ao fenótipo suscetível. Experimentos de infecção por *L. (L.) major* utilizando animais BALB/c (suscetíveis) deficientes para o gene da IL-4 mostraram que estes ainda são suscetíveis à infecção. Isto entrou em contradição com resultados de outros laboratórios que mostraram que animais suscetíveis quando depletados de IL-4 por

anticorpos monoclonais, ou através de manipulação genética, desenvolveram um fenótipo resistente (revisado por Scott *et al.*, 2004).

Quanto à subpopulações linfocitárias, considerando que a citocina IL-10 produzida por células T CD4<sup>+</sup> de perfil T<sub>H</sub>2 possa ser tão importante, resta saber se são apenas estes subtipos celulares que estão produzindo esta citocina, ou se outras subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> também estão contribuindo para esta produção de IL-10, culminando na suscetibilidade gerada em camundongos. Uma possibilidade para a fonte de IL-10 é a existência de subpopulações de células T, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que naturalmente ocorrem em animais, incluindo modelos suscetíveis à infecção por *L. (L.) major*. Estas células chamadas de células reguladoras (Treg), também ocorrem em modelos resistentes à infecção, que acabam por suprimir a reposta imune efetora gerada por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (T efetoras) que agem no intuito de eliminar o parasita do sítio de infecção (revisado por Sacks & Anderson, 2004).

As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> constituem 5-10% das células do sangue periférico de seres humanos e camundongos, e expressam constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25). Camundongos resistentes à infecção por *L. (L.) major*, após a cura clínica, mantêm um pequeno número de parasitas, concomitante à manutenção de uma imunidade à re-infecção, mas que também podem culminar num processo de reativação da doença. Neste contexto, verificou-se que estas células reguladoras estavam tão intrinsicamente ligadas ao controle da resposta imune, através da supressão da atividade de células efetoras, quanto eram as responsáveis pelo equilíbrio criado no sítio de infecção, mantendo um número reduzido de parasitas (Belkaid *et al.,* 2002). Estudos mostraram que a depleção destas células reguladoras gerou uma forte resposta imune protetora que levou a eliminação completa dos parasitas. Por outro lado, a transferência destas células reguladoras para camundongos cronicamente infectados reativou a doença (Mendez *et al.,* 2004).

Em camundongos suscetíveis à infecção por *L. (L.) major*, estas células reguladoras agem prevenindo uma resposta exarcebada do tipo  $T_H2$ , enquanto que nos animais resistentes, C57BL/6, agem controlando a resposta imune protetora  $T_H1$ ,

permitindo a persistência parasitária e ao mesmo tempo mantendo a resposta imune efetora de memória (revisado por Belkaid, 2003).

Não só o marcador CD25 é expresso na superfície celular, mas também outros como o GITR, que desempenha um papel importante na sinalização das células T que o expressam, sendo estas células reguladoras ou efetoras. Há contradições na literatura a respeito do engajamento do ligante de GITR na geração de uma sinalização, que culminaria por inibir a supressão da célula reguladora (Ji *et al.*, 2004), ou tornando células efetoras refratárias à ação destas células reguladoras (Kanamaru *et al.*, 2004).

Nem todas as características da resposta imune que levam a um fenótipo resistente ou suscetível no caso da infecção experimental por L. (L.) major, podem ser observadas durante a infecção por outras espécies de Leishmania. Na infecção experimental de camundongos BALB/c por L. (V.) braziliensis observou-se que em poucos dias houve uma rápida destruição de parasitas. Ao contrário da infecção por L. (L.) major que é observado uma multiplicação contínua destes. Quando o perfil de citocinas foi analisado, verificou-se que em resposta a infecção por L. (V.) braziliensis, células do linfonodo dos animais produziram a mesma quantidade de IFN-γ e IL-10, que os animais infectados por L. (L.) major. Com relação a IL-4, observou-se que as células dos animais infectados produziram baixas quantidades da citocina, em comparação às células dos animais infectados por L. (L.) major. Já para a produção de TNF- $\alpha$ , em ambos ensaios relacionados (L. (L.) major e L. (V.) braziliensis), níveis indetectáveis por ELISA foram observados. Quando os animais foram tratados com anticorpos anti-IFN-y, foi observado um aumento no tamanho das lesões, prevenindo os camundongos de resolverem a infecção por L. (V.) braziliensis (DeKrey et al., 1998).

Na análise da citocina IL-12, foi mostrado em ensaios de infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*, que camundongos deficientes para IL-12p40, controlaram parcialmente a infecção, enquanto animais deficientes para IFN- $\gamma$  desenvolveram lesões progressivas. Ficou evidente que a IL-12 parece não ser essencial para a produção de IFN- $\gamma$ , por células do linfonodo, sugerindo haver neste modelo outras citocinas engajadas na sinalização para produção de IFN- $\gamma$  (Souza-Neto *et al.*, 2004). Outros estudos de infecção experimental por *L. (V.) braziliensis* sugerem que diferentes genótipos de parasitas, diferenças estas observadas pela técnica de RAPD, correlacionam-se no modelo de BALB/c, com um diferente perfil no padrão de citocinas geradas (IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-12). Este fato pode estar envolvido com as diferentes formas clínicas patológicas observadas em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* (Oliveira *et al.*, 2004).

Em experimentos de infecção de macrófagos *in vitro*, foi verificado que diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* induziram a produção de diferentes padrões de quimiocinas gerando uma resposta inflamatória diferenciada, isto sugere que diferentes isolados de parasitas estão modulando diferentemente a expressão de quimiocinas pelos macrófagos infectados (Teixeira *et al.*, 2005).

Mais recentemente foi desenvolvido um modelo experimental de infecção por *L. (V.) braziliensis* onde o padrão observado foi o de uma lesão ulcerada após o inóculo parasitário feito na derme da orelha de camundongos BALB/c. Padrão este semelhante ao observado no homem. No linfonodo de drenagem destes animais células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> estavam continuamente produzindo IFN- $\gamma$  (Moura *et al.*, 2005).

#### 1.2.2. Em seres humanos.

Considerando que no Brasil a maior parte dos casos de leishmaniose cutânea é causada pela infecção por *L. (V.) braziliensis*, focaremos aqui a resposta imunológica gerada em seres humanos à infecção por este parasita.

Pacientes com leishmaniose cutânea (CL) decorrente de infecção por *L. (V.) braziliensis* exibem imunidade específica mediada por células, inclusive nos pacientes que desenvolvem a forma mucocutânea da doença (MCL), onde ocorre uma resposta exarcebada decorrente da infecção. Estes pacientes tendem a apresentarem forte reação de Montenegro quando comparados aos pacientes com a forma cutânea apenas, com intensa proliferação linfoblástica medidas *in vitro* após estimulação de PBMC com antígenos parasitários, e produção de IFN-γ (revisado por Brodskyn *et al.*, 2003).

Quando comparado pacientes com a forma de cura espontânea da doença àqueles com a forma ativa da leishmaniose cutânea (CL) e mucocutânea (MCL), observou-se que aqueles de cura espontânea apresentavam um DTH maior, mas com um índice de proliferação celular e produção de IFN- $\gamma$  similares aos pacientes com a MCL, e aumentada produção de IFN- $\gamma$  quando comparados àqueles com CL. Já os títulos de anticorpos de pacientes com a forma de cura espontânea foram bem menores quando comparados aos títulos de pacientes com as formas CL ou MCL (Carvalho *et al.*, 1995).

Outros estudos mostraram que o tratamento de pacientes com CL na sua fase inicial, com antimoniais, não preveniu a formação de úlceras, e que os pacientes possuíam uma forte resposta imune celular. Os pesquisadores especularam a respeito de que a resposta inflamatória exarcebada no local, seria um fator relevante na patogênese da doença (Machado *et al.*, 2002). O mesmo grupo mostrou também que pacientes assintomáticos e com teste positivo de Montenegro por anos, sendo assim denominados com a forma subclínica de leishmaniose cutânea, quando comparados a pacientes com a forma ativa (CL), apresentaram em ensaios de cultura de linfócitos baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  e aumentada produção de IL-5, sugerindo que nestes pacientes, durante a infecção por *L. (V.) braziliensis*, houve uma modulação da resposta imune (Follador *et al.*, 2002).

Em experimentos de resposta humana *in vitro* com células de sangue periférico (PBMC), tanto em pacientes com CL como MCL, altos níveis de IFN- $\gamma$  foram observados no restímulo destas células, em resposta a antígenos parasitários. Isto correlaciona-se ao fato de que mais tarde durante o processo de infecção no homem, altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são encontrados em ambos os tipos de leishmaniose, com diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  após o tratamento quimioterápico com antimoniais. Assim, é possível que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  estejam envolvidos ambos no controle da multiplicação parasitária nas fases iniciais da infecção e no dano ao tecido, vistos na leishmaniose tegumentar (revisado por Brodskyn *et al.*, 2003).

O papel da citotoxicidade mediada por células entre os mecanismos de defesa ou dano ao tecido, não está claro. Pesquisadores observaram a presença de células NK, T CD8<sup>+</sup> e T CD45RO<sup>+</sup>, assim como uma forte expressão de moléculas associadas com propriedades citotóxicas (TIA-1), no infiltrado dérmico de pacientes com CL. A
presença destas células com capacidade citolítica vão a favor de uma ativa participação de células NK e T CD8<sup>+</sup> na patogênese da doença. Estas células podem exercer um papel não só na morte parasitária, como também no desenvolvimeno de úlceras (revisado por Brodskyn *et al.*, 2003).

Mais recentemente foi mostrado que pacientes com MCL apresentam um maior número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no sítio de formação de lesão, quando comparado a pacientes com CL. Ainda, estes pacientes com MCL, apresentaram um maior número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , comparado aos pacientes com CL. As células produtoras desta citocina eram T CD4<sup>+</sup> na sua maioria, e T CD8<sup>+</sup>. Interessantemente, os pacientes com MCL apresentaram uma menor quantidade de células que expressam o receptor para IL-10, assim como a expressão deste receptor também estava diminuída, quando comparado a pacientes com CL. Os resultados também mostraram que pacientes com MCL possuem uma maior quantidade de células produtoras de granzima A, e que células T CD8<sup>+</sup> são sua fonte produtora. Baseados nestes resultados, foi proposto que a forma mucocutânea da doença esteja relacionada a hiperresponsividade celular, com produção elevada de IFN- $\gamma$  e de granzima A, e ainda, com baixa responsividade a IL-10 (Faria *et al.*, 2005).

Células de pacientes que apresentaram cura da forma mucocutânea ou cutânea da doença, respondem a uma ampla gama de antígenos parasitários, ao contrário dos que fazem os pacientes com a forma ativa, sem cura espontânea ou difusa da leishmaniose cutânea, que respondem a poucos. Este fato sugere que o controle e resolução da leishmaniose, assim como resistência à re-infecção, pode estar associado a presença de resposta de células T contra vários e distintos antígenos de *Leishmania* (Melby *et al.*, 1989).

# 1.3. O desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose cutânea.

Até o momento, não existe vacinação de rotina contra a leishmaniose em nenhum país do mundo. Várias preparações vacinais estão em diferentes estágios de desenvolvimento pré-clínicos, em modelos experimentais e no homem (revisado por Handman, 2001). Dentro das vacinas em desenvolvimento para leishmaniose, vários métodos estão sendo empregados, indo desde parasitas mortos por calor até estratégias avançadas consistindo de vírus recombinantes.

# 1.3.1. Os antígenos candidatos à vacina contra leishmaniose cutânea.

Inúmeros antígenos de diversas espécies de *Leishmania* estão sendo testados para fins de desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose. Dentre os vários antígenos testados, vamos nos focar em 4 destes antígenos que foram alvos deste trabalho: LACK (receptor para proteína C-kinase ativada de *Leishmania*), TSA (antioxidante tiol-específico), LeIF (fator ribossomal de elongação e iniciação nuclear de *Leishmania*) e LmSTI1 (proteína 1 de estresse induzível de *Leishmania*).

A identificação da proteína LACK foi feita através da busca de um antígeno de *L. (L.) major* reconhecido por um clone de linfócitos T  $CD4^+$  T<sub>H</sub>1 capaz de induzir imunidade protetora contra a infecção em camundongos da linhagem suscetível BALB/c. Com o uso de uma genoteca de expressão, foi isolada a proteína de peso molecular aparente de 36 KDa codificada pelo gene do receptor para proteína C-kinase ativada de *Leishmania* (LACK), e que possuiu um homólogo em humanos, a RACK. A imunização de camundongos da linhagem suscetível BALB/c com este antígeno recombinante na presença de IL-12 levou a uma imunidade protetora significativa contra a infecção experimental (Mougneau *et al.*, 1995).

Estudos posteriores ratificaram a capacidade do antígeno LACK de conferir imunidade protetora quando administrado como proteína recombinante ou DNA plasmidial. Em experimentos comparando as formulações de vacinas, DNA plasmidial versus proteína recombinante, na presença ou não de adjuvantes, como IL-12 recombinante (rIL-12), mostraram que a imunização subcutânea com este antígeno protegeu animais suscetíveis a infecção por *L. (L.) major*, na formulação de DNA apenas ou em adição de rIL-12, mas não na formulação da proteína recombinante somente. Experimentos com o uso de anticorpos anti-IL-12, foi possível determinar que a IL-12 é uma importante citocina durante o processo de imunização para indução à produção de IFN- $\gamma$ . Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que esta resposta imune gerada era duradoura, pois animais desafiados várias semanas após a imunização continuaram protegidos contra o desafio com *L. (L.) major* (Gurunathan *et al.*, 1997).

Experimentos mais recentes utilizando a proteína recombinante LACK na presença de CpG ODN foi observado que mesmo 6 meses após a imunização, os animais suscetíveis continuavam protegidos contra desafio por *L. (L.) major*. Ao verificarem o mecanismo envolvido na adição de CpG ODN, observaram que células dendríticas não plasmocitóides foram ativadas pelo antígeno associado a CpG ODN, de forma a produzirem mais IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , em resposta ao antígeno, quando comparado ao grupo de animais imunizados com a proteína recombinante apenas (Shah *et al.*, 2003).

O papel de células T CD8<sup>+</sup> na manutenção de imunidade do tipo T<sub>H</sub>1 foi estudado após a imunização com DNA codificando o antígeno LACK. A depleção *in vivo* de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *L*. (*L.*) *major* reduziram o número de células do linfonodo (T CD4<sup>+</sup>) produtoras de IFN- $\gamma$ , assim como a imunidade protetora (Gurunathan *et al.*, 2000).

O antígeno TSA de *Leishmania* foi descrito em *L. (L.) major* após seleção de uma genoteca de expressão que visava caracterizar as proteínas presentes numa preparação denominada "filtrado de cultura de promastigotas do parasita". Esta preparação havia sido anteriormente descrita como capaz de induzir imunidade protetora. A análise da seqüência deduzida de aminoácidos demonstrou que este gene possui homologia com um gene presente em outros eucariotos (proteínas antioxidantes tiol-específicas, Webb *et al.*, 1998). Baseada nesta homologia este antígeno foi denominado TSA de *Leishmania*.

A imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante TSA combinada com rIL-12 resultou na indução de forte resposta imune celular do tipo  $T_H1$ , e imunidade protetora contra a infecção experimental com *L. (L.) major*. Esta proteína recombinante também induziu a proliferação celular de pacientes com leishmaniose, e níveis detectáveis de títulos de anticorpos foram obtidos em resposta ao antígeno, tanto em pacientes com a forma cutânea, quanto visceral de leishmaniose (Webb *et al.*, 1998). Em experimentos em primatas não humanos (macacos Rhesus),

observaram proteção nos animais imunizados com o antígeno na formulação de proteína recombinante na presença de rIL-12 e do antígeno LmSTI1 (Campos-Neto *et al.*, 2001).

O antígeno LeIF é um fator ribossomal de elongação e iniciação nuclear, possuindo uma proteína homóloga no homem. Este antígeno foi identificado por seleção em genotecas de *L. (V.) braziliensis*, utilizando-se soro de pacientes com a forma mucocutânea da doença. Monócitos, macrófagos e células dendríticas humanas respondem *in vitro* ao antígeno LeIF, com a produção de IL-12p70, em com reduzida produção de IL-10 (Probst *et al.*, 1997). Foi observado que este antígeno estimula o sistema imune a produzir IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$ , sendo assim um indutor de resposta do tipo T<sub>H</sub>1 (revisado por Coler & Reed, 2005).

Células de animais infectados com *L. (L.) major* respondem ao antígeno de modo específico, sendo capazes de proliferarem e produzirem IFN- $\gamma$  *in vitro*. Neste trabalho foi descrito que animais imunizados com o antígeno LeIF na formulação de proteína recombinante, na ausência de adjuvantes, geraram células no linfonodo capazes de proliferarem e produzirem IFN- $\gamma$  *in vitro* após o estímulo com o antígeno recombinante, além de induzirem uma imunidade protetora parcial contra a infecção experimental com *L. (L.) major* (Skeiky *et al.*, 1998).

O antígeno LmSTI1 é o gene da proteína 1 de estresse induzível, e foi identificado por seleção de uma genoteca de cDNA de formas amastigotas de *L. (L.) major*, utilizando soro de camundongos infectados com o parasita (Webb *et al.*, 1996). Neste trabalho foi observado que a proteína recombinante LmSTI1 gerava forte resposta do tipo  $T_H1$  proliferativa de células de linfonodo de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*. Além disto, a análise do soro humano de pacientes com leishmaniose cutânea, visceral, e visceral pós-calazar indicou que a maioria dos indivíduos destes grupos clínicos apresentava resposta imune humoral contra LmSTI1. Em experimentos de imunização utilizando o antígeno na formulação de proteína recombinante na presença de rIL-12, este antígeno foi capaz de induzir imunidade protetora em camundongos BALB/c após o desafio com *L. (L.) major*. O mesmo foi observado em macacos Rhesus imunizados com os antígenos recombinantes TSA e

LmSTI1 na presença de rIL-12 e infectados com *L. (L.) major* (Campos-Neto, *et al.*, 2002).

Os quatro antígenos descritos acima foram testados inicialmente em formulações que continham cada um deles isoladamente. Mais recentemente estes antígenos foram testados de diversas maneiras, na forma de coquetel ou fusionados, nas formulações de vacinas de DNA e proteína recombinantes, com a adição de adjuvantes, e em sua maioria mostraram ser capazes de conferirem proteção de parcial a alta, nos modelos experimentais utilizados para infecção com *L. (L.) major*, inclusive nos casos de modelos animais de primatas não humanos (macacos Rhesus).

A imunização com um coquetel de DNA contendo plasmídios com os genes dos antígenos LACK, TSA e LmSTI1 conferiu proteção total em camundongos desafiados com formas promastigotas de *L. (L.) major*. Neste estudo foi observado ainda que esta resposta imune gerada pela imunização foi duradoura, pois mesmo quando o desafio foi realizado após 12 semanas da última dose vacinal, os animais continuaram completamente protegidos. A proteção nos animais imunizados estava associada ao recrutamento de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para o sítio de infecção, onde pouquíssimos parasitas foram encontrados (Mendez et al., 2001).

Este mesmo conjunto de antígenos, LACK, TSA e LmSTI1, foram estudados pelo mesmo grupo de pesquisadores, e foi observado que na formulação de DNA, o antígeno LACK sozinho, conferiu proteção parcial, enquanto os antígenos LmSTI1 e TSA combinados, ou em adição ao antígeno LACK, mostraram gerar uma resposta imune protetora mais eficiente. Várias vias de imunização foram testadas (intradérmica, intramuscular e subcutânea). Os resultados mostraram que a via intradérmica foi a via de imunização que gerou o melhor grau de proteção nos camundongos desafiados (Mendez *et al.*, 2002).

Os antígenos TSA, LeIF e LmSTI1 foram estudados também na formulação de proteína recombinante fusionada (Leish-111f) na presença do adjuvante MPL-SE. Experimentos de imunização demonstraram que esta formulação foi capaz de conferir proteção total em camundongos BALB/c desafiados com *L. (L.) major*. Esta proteção está associada à presença de uma reposta imune celular do tipo  $T_H1$  com alta produção

de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-4. Interessantemente, em animais imunizados e desafiados com *L. (L.) amazonensis*, somente proteção parcial foi obtida (Coler *et al.*, 2002 e Skeiky *et al.*, 2002). Este resultado demonstrou que a formulação contendo o antígeno Leish-111f na presença do adjuvante MPL-SE pode ser testado em vacinações humanas.

2. Objetivos

Várias estratégias de imunização experimental contra leishmaniose cutânea têm sido utilizadas nos últimos anos, ainda mais com o advento da tecnologia do DNA recombinante, permitindo estratégias mais avançadas de serem exploradas na área de imunização. Dentro disto, a espécie *Leishmania (L.) major*, causadora de leishmaniose cutânea, tem sido utilizada como modelo para estudos de resposta imunológica, inclusive durante ensaios de vacinação. Vários antígenos têm sido descritos como sendo protetores em estratégias de imunização experimental, sendo então fortes candidatos ao desenvolvimento de vacinas aplicadas a humanos. Mas há de se considerar que vários grupos de pesquisadores têm mostrado resultados contraditórios aos obtidos com o modelo de *L. (L.) major*, onde dependendo da espécie estudada, antígenos parasitáriois podem diferir na capacidade de gerar uma resposta imune protetora.

Diante disto decidimos explorar se antígenos de *L. (V.) braziliensis* seriam capazes de induzir uma resposta imune protetora em estratégias de imunização, contra a infecção experimental. Um ponto de partida para seleção destes antígenos, diante dos vários existentes, foi utilizar aqueles previamente descritos para *L. (L.) major*. Os antígenos alvos foram LACK (receptor para proteína C quinase ativada), TSA (anti-oxidante tiol específico), LeIF (fator ribossomal de elongação e iniciação de *Leishmania*) e LmSTI1 (proteína 1 de estresse induzível de *Leishmania major*).

Foram os objetivos específicos deste trabalho:

- Isolamento e sequenciamento dos genes que codificam os antígenos LACK, TSA, LeIF E LbSTI1 de L. (V.) braziliensis;
- 2) Análise da expressão destes antígenos nas diferentes formas do parasita;
- Caracterização da resposta imune induzida pela imunização com estes antígenos, em diferentes estratégias vacinais;

- 4) Padronização de um modelo de infecção experimental com *L. (V.) braziliensis* em camundongos isogênicos;
- 5) Avaliação da imunidade protetora induzida pela imunização com os antígenos por nós isolados de *L. (V.) braziliensis*;
- 6) Utilização de anticorpos monoclonais anti-GITR durante processos de infecção por *Leishmania*, visando a resposta imune efetora.

3. Material e Métodos

# 3.1. Animais e parasitas.

Camundongos com idades entre 6 e 8 semanas das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram utilizados neste estudo, e adquiridos da Universidade de São Paulo (Biotério Central-ICB), Universidade Federal de São Paulo (CEDEME), e JAX<sup>®</sup> Mice ("Jackson Laboratory", EUA). Hamsters Golden (*Nectomys squamipes*) foram adquiridos do Instituto Biológico (USP-SP), via CEDEME (UNIFESP).

Foram utilizadas as seguintes cepas de formas promastigotas dos parasitas das espécies: *Leishmania (V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/01/BA788, cepa Torrez, e cepa MHOM/BR/75/M2903; e *L. (L.) major*, cepa Friedlin e cepa Friedlin clone V1.

# 3.2. Composição das soluções e tampões utilizados.

- <u>Denhardt's (5 X)</u>: BSA 0,1%, ficoll 0,1%, polivinilprolidona 0,1% (todos da Sigma).

- <u>Gel de Agarose</u>: agarose 1% (Life Technologies), TAE (1 X), brometo de etídio (0,5 μg/mL, Sigma).

- SDS-PAGE - Mini-gel (para 2 géis):

Gel de separação 12%: Acrilamida 30%/Bis acrilamida 0,8% - 3,5 mL, Tris-HCl 0,75 M / SDS 0,2%, pH 8,8 - 4,5 mL, Persulfato de amônio 10% - 100  $\mu$ L, TEMED - 10  $\mu$ L, água bidestilada - 1 mL.

Gel de empilhamento 3%: Acrilamida 12%/ Bis acrilamida 1,2% - 1,25 mL, Tris-HCl 0,25 M / SDS 0,2%, pH 6,8 – 2,5 mL, Persulfato de amônio 10% - 100  $\mu$ L, TEMED 10  $\mu$ L, água bidestilada – 1,25 mL.

- <u>SDS-PAGE – Gel grande (para 1 gel):</u>

Gel de separação 10%: Acrilamida 30%/Bis acrilamida 0,8% - 5 mL, Tris-HCl 1 M, pH 8,8 – 5,6 mL, SDS 10% - 200  $\mu$ L, Glicerol – 500  $\mu$ L (Synth), Persulfato de amônio 10% - 160  $\mu$ L, TEMED - 15  $\mu$ L, água bidestilada - 4,4 mL. Gel de empilhamento 5%: Acrilamida 30%/Bis acrilamida 0,8% - 1,6 mL,

Tris-HCl 1 M, pH 6,8 – 1,25 mL, SDS 10% - 200 μL, Persulfato de amônio 10% - 80 μL, TEMED - 15 μL, água bidestilada – 7 mL.

- <u>PBS</u>: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

 <u>PBS/Leite-BSA</u>: PBS acrescido de 5% de leite desnatado (Molico) e 2,5% de BSA (Sigma).

- <u>PBS-T20</u>: PBS acrescido de Tween 20 na concentração de 0,05%.

- Ponceau-S: Ponceau 0,1% (Sigma) em ácido acético 10% (Merck).

<u>Saponina à 0,1%</u>: 1g saponina, 100mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 2,4g de HEPES, 1g BSA, p.s.p. 1L água, pH 7.4.

- Solução A: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0.

- <u>Solução B</u>: NaOH 200 mM, SDS 1%.

- Solução C: acetato de potássio 3 M, ácido acético 5 M.

<u>Solução Tampão de Ligação</u>: NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, e
 PMSF 2 mM.

- Solução CHAPSO: CHAPSO 1% (Sigma) e Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

 <u>Solução Corante Azul de Coomassie</u>: "Coomassie blue" R250 0,05% (Life Technologies), metanol 45% (Merck), ácido acético 10%.

- Solução Descorante: etanol 45%, ácido acético 10%.

<u>Solução Denaturante de Proteína</u>: uréia 8 M, DTT 20 mM, Tris-HCl 0,1 M (pH 9,0), EDTA 3 mM.

<u>Solução de Hidridação</u>: 50% formamida, SSC 5X, SDS 0,5%, EDTA 1 mM, leite
 em pó 0,2% (Molico) e água suficiente para 25 mL.

- <u>SSC 20 X</u>: NaCl 3 M, citrato de trisódio 0,3 M.

- <u>STET</u>: Sacarose 8%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM e Triton X-100 5%.

- <u>TAE (1 X</u>): Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

- <u>Tampão ACK</u>: . NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,0.

- <u>Tampão Carbonato 0,05 M</u>: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,035 M, pH 9,6.

- <u>Tampão de Amostra para Eletroforese de DNA</u> (5 X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%.

- <u>Tampão de Amostra para Gel de Seqüenciamento</u>: "blue dextran/EDTA" (Perkin-Elmer), formamida deionizada (Amresco) na proporção de 1:6.

<u>Tampão de amostra para SDS-PAGE</u> (4 X): glicerol 20%, SDS 4%,
2-Mercaptoetanol 10%, Tris-HCl 60 mM (pH 6,8), azul de bromofenol 0,3%.

- Tampão de corrida: SDS 0,1%, glicina 192 mM, Trizma base 25 mM, pH 8,3.

- <u>Tampão PBS/Triton</u>: 10 ml PBS, 100 μL Triton X-100 (Sigma), lisozima 4 mg/mL (Sigma), PMSF 1 mM, tripsina 100 μg/mL.

- <u>Tampão de transferência</u> ("immunoblot"): glicina 192 mM, Trizma base 25 mM, metanol 20%.

- <u>TBE (1 X)</u>: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3.

- <u>TE</u>: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

- <u>TELT</u>: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%.

- <u>Tris-HCl</u>: Trizma base 1 M. O pH desta solução é ajustado com HCl.

- <u>Tampão de Lavagem</u>: NaHPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, uréia 8 M e água bidestilada suficiente para a quantidade desejada, e o pH ajustado para 8,0.

# 3.3. Meios de cultura

# 3.3.1. Meios para cultura de bactérias.

- 2Y/T: 3,2 g peptona, 2,0 g extrato de levedura, 1,0 g NaCl e água destilada suficiente para 200 mL.

- 2Y/T/AMP: TB acrescido de ampicilina 100 µg/mL.

- <u>LB</u>: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, pH 7,0.

- <u>LB sólido</u>: LB, ágar (Difco) 1,5%.

- LB/AMP: LB acrescido de ampicilina 100 µg/mL (Sigma).

<u>SOC</u>: bactotriptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L e 10 mL de
 KCl 250 mM, pH 7,0 acrescido de glicose 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

- <u>SOC/AMP</u>: SOC acrescido de ampicilina 100 µg/mL.

- <u>TB</u>: 12 g de bactotriptona, 24 g de extrato de levedura e 4 mL de glicerol em 900 mL de água destilada, acrescido posteriormente com 100 mL de uma solução de  $KH_2PO_40,17$  M e  $K_2HPO_40,72$  M.

- <u>TB/AMP</u>: TB acrescido de ampicilina 100  $\mu$ g/mL.

<u>FB</u>: glicerol 10%, KCl 100mM, CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O 50mM, acetato de potássio 10 mM, pH 6,2.

# 3.3.2. Meio para cultura de células.

- <u>Meio de Diferenciação</u>: meio RPMI + 30% de sobrenadante de células L-929 (SN de L) + 20% de SFB, que foram filtrados em filtros 0,22 µm.

- Meio de Manutenção: meio RPMI + 10% de SFB + 5% de SN de L.

- <u>RPMI Simples</u>: Meio RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), HEPES 10 mM (Sigma), bicarbonato de sódio 24 mM (Life Technologies), penicilina G (Sigma) 59 mg/L e estreptomicina (Sigma) 130 mg/L, pH 7,2.

- <u>RPMI 10%</u>: RPMI simples suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies).

# 3.3.3. Meios para cultura de linfócitos.

- <u>RPMI 10% Completo</u>: RPMI simples suplementado com solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol), piruvato de sódio 1 mM, 2-ME 5 X 10<sup>-5</sup> M, solução de vitaminas (1% vol/vol), L-glutamina 2 mM (todos obtidos da Life Technologies) e soro fetal bovino 10% (Hyclone, vol/vol), pH 7,4.

# 3.3.4. Meio para cultura de parasitas.

- <u>Meio 199 (Simples)</u>: Meio 199 (GIBCO BRL) suplementado com HEPES 40 mM, adenina 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, hemina 5 mg/mL (em 50% de trietanolamina), penicilina G 59 mg/L (Sigma) e estreptomicina 130 mg/L (Sigma) pH 7,2.

- <u>Meio 199/S</u>: Meio 199 simples suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL).

- <u>Meio NNN</u>: Meio ágar 14g, NaCl 6 g e água destilada q.s.p. 1 L.

- <u>Obtenção de SLA</u>:  $1x10^8$  parasitas/mL foram lavados e ressuspensos em PBS estéril, e então congelados e descongelados respectivamente, em gelo seco e banho à 37°C, por 5-6 vezes, quando então foram armazenados à -80°C até a sua utilização. Foi estimada uma concentração de 50 µg/mL de antígeno.

# 3.4. Manutenção dos parasitos in vitro

Os parasitos utilizados nos experimentos foram mantidos em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Costar) contendo meio de cultura axênica, meio 199/S. Às culturas de *L. (V.) braziliensis* foi adicionado 2% de urina masculina humana de adulto, previamente filtrada em filtros 0,22  $\mu$ M (Costar). As culturas foram mantidas em estufa apropriada à 26°C.

O repique dos parasitos foi feito periodicamente. Brevemente, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, ajustados para uma concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL em garrafa de cultura, e incubados em estufa.

#### 3.5. Manutenção dos parasitos in vivo

A fim de manter a infectividade dos parasitas da espécie *L. (V.) braziliensis,* utilizados em experimentos de infecção de hamsters Golden e camundongos BALB/c e C57BL/6, assim como *L. (L.) major* utilizados em experimentos de infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6, estes foram inoculados

periodicamente nos respectivos modelos animais. Os protocolos utilizados para as infecções estão descritos adiante.

### 3.6. Obtenção de DNA genômico das espécies de Leishmania.

O DNA genômico das espécies de Leishmania foi obtido a partir de cultura axênica de formas promastigotas, sendo extraídos pelo método TELT. Brevemente, 1x10<sup>8</sup> parasitas foram centrifugados à 8.000 x g, por 2 minutos, sendo o precipitado formado ressuspenso em 150 µL de TELT, este foi homogeneizado e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 150 µL de fenol:clorofómio:álcool isoamílico (25:24:1, Life Technologies) e homogeneizado por inversão por 5 minutos, sendo então centrifugado à 15.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa sobrenadante foi transferida para outro tubo, onde foi acrescentado etanol absoluto Vol/2Vol, respectivamente. O tubo foi homogeneizado por inversão por 2 minutos, e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. Após precipitação do DNA, foram feitas centrifugações seriadas de lavagem do DNA, utilizando 1 mL de etanol à 70%. Este DNA foi ressuspenso em água Milli Q contendo RNase A 50 µg/mL. Em seguida o DNA foi quantificado em gel de agarose 1%, de acordo com o padrão de peso molecular  $\lambda$  Hind III. Brevemente, as amostras foram submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, em tampão TAE 1X. Como referência, utilizamos os fragmentos do bacteriófago  $\lambda$  digerido com a enzima *Hind* III, cujos tamanhos variam de 23 a 0.5 kb. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após a adição de tampão de amostra para diluição final de 1X.

# 3.7. Amplificação e purificação de genes das espécies de Leishmania.

Os oligonucleotídeos por nós utilizados para amplificar sequências similares aos genes de interesse foram baseados nas sequências obtidas através do acesso ao site do Banco de Genes ("GenBank"), <u>www.ncbi.nlm.nhi.gov/</u>.

Os genes lack, tsa, leif, lbstil da espécie L. (V.) braziliensis, foram amplificados utilizando-se oligonucleotídeos específicos como descritos na tabela 2, sintetizados pela Life Technologies. A reação de PCR foi feita utilizando-se a enzima "Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity" (Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, para cada 500 ng de amostra de DNA foi adicionado tampão de amplificação 1X, "dNTP mix" 0,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U da enzima polimerase. As condições de amplificação foram: 1 ciclo à 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos à 94°C por 30 segundos, nas respectivas temperaturas de anelamento (°C) por 30 segundos, e 68°C /kb a ser amplificado. As amostras foram mantidas à 4°C e submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, as respectivas bandas resultantes da amplificação em torno de 1 kb foram recortadas do gel e purificadas pelo kit GeneClean II (BIO 101), de acordo com especificações do fabricante. Brevemente, calculamos o volume de gel presente em cada tubo, adicionamos 3 volumes de uma solução de iodeto de sódio, e aquecemos os tubos à 55°C por 5 minutos até que os pedaços de gel estivessem todos dissolvidos. Em seguida, acrescentamos 5 µL de microesferas de vidro e incubamos por 16-20 horas, a temperatura ambiente e sob agitação constante. Os tubos foram então centrifugados a 7.500 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram retirados cuidadosamente e reservados em outros tubos. Os precipitados contendo as microesferas de vidro foram ressuspensos em 200 µL da solução de lavagem e centrifugados novamente por 1 minuto nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram desprezados e o mesmo processo foi repetido por 2 vezes. Finalmente, os precipitados foram ressuspensos em 12  $\mu$ L de água e os tubos incubados à 55°C por 30 minutos, para que houvesse a dissociação do DNA das microesferas. Os produtos foram dosados em gel de agarose 1% como descrito anteriormente.

**Tabela 2**: Sequências oligonucleotídicas utilizadas para amplificação por PCR dosgenes clonados de L. (V.) braziliensis.

Gene ou Epítopo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo anti-senso
lack	5′- GGG <u>GGA TCC</u> GAT GAA CTA CGA GGG TCA C – 3′	5'- GGG <u>GAA TTC</u> TTA CTC GGC GTC GGA GAT – 3'
tsa	5'- GG <u>G GAT CC</u> G ATG TCC TGC GGT AAC GCC AAG – 3'	5'- GGG <u>GAA TTC</u> TTA CTG CTT GCT GAA GTA TCC – 3'
lmsti l	5′- GG <u>G GAT CC</u> G ATG GAC GCA ACT GAG CTG AAG – 3′	5′- GGG <u>GAA TTC</u> CTA CTG ACC AAA ACG AAT GAT – 3′
<i>lmsti1</i> (oligo interno)	5'- CAG GGC CGG CTG TAC ATG GAA – 3'	
leif	5′- GG <u>G GAT CC</u> G ATG TCG CAG CAA GAC CGA GTT– 3′	5'- GGG <u>GAA TTC</u> TCA CTC GCC GAG GTA GGC GGC– 3'
<i>leif</i> (oligo interno)	5'- GGG TGG CAC GCG CGT GCA GGA – 3'	
Epítopo para linfócito T CD4 <sup>+</sup> do antígeno LACK	5'- <u>GAT C</u> CG CCG TCG CTG GAA CAC CCG ATC GTG GTG TC GGC AGC TGG GAT -3'	
Epítopo para linfócito T CD4 <sup>+</sup> do antígeno LACK		5'- <u>AAT TA</u> T CCC AGC TGC CGG ACA CCA CGA TCG GGT GTT CCA GCG ACG GCG -3'

**Legenda**: Em sublinhado: sequência oligonucleotídica das enzimas de restrição utilizadas nas respectivas clonagens.

# 3.8. Clonagem dos genes amplificados das espécies de *Leishmania* no vetor genético pMOS.

As ligações dos DNAs obtidos no ítem acima (genes *lack, tsa, leif* e *lbsti1* da espécie *L. (V.) braziliensis*) foram feitas utilizando-se o "pMOSBlue bluntended cloning kit" (Amersham), seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, utilizamos uma proporção inserto:vetor de 4:1 com a quantidade fixa do vetor pMOS (50 ng). Antes de realizarmos as ligações, os produtos de PCR foram tratados com uma proteína kinase da seguinte maneira: para cada reação de 10  $\mu$ L finais adicionamos 1  $\mu$ L de tampão pK, 0,5  $\mu$ L de DTT 100 mM, 1  $\mu$ L da mistura enzimática para fosforilação "pK enzyme mix", a quantidade desejada do produto de PCR, e água. Estas reações foram incubadas à 22 °C por 40 minutos, seguindo-se à inativação da enzima à 75°C por 10 minutos. As reações foram então incubadas em gelo por 2 minutos e acrescentamos 1  $\mu$ L do vetor pMOS 50 ng, além de 1  $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase. As reações foram incubadas por 16-20 horas à 14°C.

# 3.9. Transformação de bactérias com DNA plasmidial.

#### 3.9.1. Preparação de bactérias competentes.

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* (cepas DH5 $\alpha$ , BL21 ou vindas no "pMOSBlue blunt-ended cloning kit") foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB, seguindo-se incubação por 16 horas à 37 °C, sob agitação constante. O inóculo foi então diluído em meio LB na proporção de 1:50 e incubado à 37 °C sob agitação constante até que a DO<sub>600</sub> estivesse em torno de 0,6. O recipiente contendo as bactérias foi então incubado em gelo por 1 hora. Seguiu-se uma centrifugação à 1.000 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as bactérias ressuspensas em 1/3 do volume inicial em meio FB, e incubadas em gelo por 60 minutos. Seguiu-se nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e após desprezar-se o sobrenadante, o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 1 / 12,5 do volume inicial em meio FB. As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 100  $\mu$ L e armazenadas à – 70 °C.

#### 3.9.2. Transformação em bactérias competentes.

### 3.9.2.1. Transformação de bactérias com plasmídios.

Para as transformações, 10-20 ng do DNA plasmidial foi adicionado a tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 20  $\mu$ L de bactérias competentes. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram submetidos a 42 °C por 2 minutos e incubados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 80  $\mu$ L de meio SOC e os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora, sob agitação. O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e estas foram incubadas à 37 °C durante a noite para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

#### 3.9.2.2 Transformação de bactérias com produtos de ligação.

Alíquotas de 100  $\mu$ L de bactérias competentes foram descongeladas e a cada uma se acrescentou 4  $\mu$ L dos produtos da ligação, seguindo-se incubação por 30 minutos no gelo. Após esse período, os tubos foram incubados à 42°C por 2 minutos e incubados no gelo por mais 10 minutos. A cada tubo foi acrescentado 400  $\mu$ L de meio SOC, e os mesmos foram incubados a 37 °C sob agitação constante por 1 hora. O volume total da suspensão bacteriana foi então semeado em placas de LB sólido contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Seguiu-se a incubação das placas por 16-20 horas em estufa a 37 °C, para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

No caso de transformações com construções contendo o plasmídio pMOS, a semeadura das bactérias foi feita em placas de LB sólido contendo ampicilina 50

 $\mu$ g/mL (Sigma) e tetraciclina 15  $\mu$ g/mL (Sigma). Antes da semeadura, as placas foram tratadas com 35  $\mu$ L de X-gal 50 mg/mL (USB) e 20  $\mu$ L de IPTG 100 mM (Life Technologies). As placas foram então incubadas por 16-20 horas em estufa à 37 °C. As colônias apropriadas foram então selecionadas para análise posterior.

### 3.10. Obtenção de DNA plasmidial.

# 3.10.1. Pequena escala (método de lise alcalina).

Para a análise dos plasmídios recombinantes, colônias bacterianas foram inoculadas em 4 mL de meio LB/AMP e incubadas à 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante. Um mL e meio da suspensão bacteriana foi então transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugada à 7.500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se mais 1,5 mL da suspensão bacteriana e o tubo foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. Ao precipitado bacteriano se acrescentou 100 µL da solução A, e seguiu-se a homogeneização. Foi adicionado 200 µL da solução B e o tubo foi invertido suavemente por 2 vezes, e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos. Após este tempo, foi adicionado 200 µL de solução C e o tubo foi invertido suavemente por 8 vezes, e incubado em gelo por 25-30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 7.500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, onde o sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol (Merck), e misturado por inversão (4 vezes). O tubo foi então colocado à -20 °C por 2-3 horas, e centrifugado a 12.500 x g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e homogeneizado. Seguiu-se nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, porém por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo seco a 37 °C por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 30-50 µL de água contendo RNase A 60 µg/mL, e incubado à 37 °C por 16-20 horas. A análise dos plasmídios recombinantes foi feita em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

# 3.10.2. Pequena escala (método "Boilling Prep").

As devidas colônias bacterianas foram crescidas em meio de cultura LB/Amp por 16-18 horas à 37°C e sob agitação constante. Os precipitados bacterianos foram obtidos como já descrito e tratados para obtenção do DNA plasmidial. Brevemente, aos precipitados bacterianos foi adicionado 360 µL de STET em cada tubo, e homogeneizados. Então foi acrescentado 50 µL de lisozima 10 mg/ml (Sigma) e incubado a temperatura ambiente por 2 minutos. Logo após, os tubos foram incubados à 95°C por 2 minutos e então centrifugados à 15.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente. O precipitado formado foi retirado com auxílio de um palito e ao sobrenadante foi acrescentado 500 µL de isopropanol (Vol/Vol), e deixados por 1-2 horas à -20°C, para que ocorresse a precipitação do DNA plasmidial. Em seguida os tubos foram centrifugados a 19.000 x g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado por 2 vezes com etanol 70% seguindo-se as centrifugações nas mesmas condições anteriores, por 5 minutos. Após secagem do DNA, a ressuspensão do mesmo foi feita com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA) contendo RNase A, como descrito no método de lise alcalina.

# 3.10.3. Larga escala (método do gradiente de césio).

Uma colônia de bactérias DH5α transformada com o plasmídio de escolha foi semeada em 50 mL de meio SOC/AMP (pré-inóculo) e crescida à 37 °C sob agitação constante. Após 16 horas, 50 mL da suspensão saturada de bactérias foi adicionada à 450 mL de meio TB/AMP, e incubadas nas mesmas condições descritas.

As bactérias foram colhidas por centrifugação 4.000 x g por 10 minutos à 4 °C, e o sedimento de bactérias foi ressuspenso em 21 mL da solução A. Em seguida, foi adicionado 13 mL da solução B e, por fim, 10 mL da solução C. A mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada em gelo por 10 minutos. O lisado bacteriano foi centrifugado à 10.000 x g por 15 minutos à 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado em gaze e transferido para provetas. Ao volume obtido do sobrenadante adicionou-se 1 Vol de isopropanol (Merck) e seguiu-se uma incubação de 2-24 horas à 4 °C. O DNA foi precipitado por centrifugação à 7.000 x g à 4 °C por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em tampão TE, e 1 volume de uma solução gelada de LiCl (Synth) 5 M foi adicionada. Em seguida, o material foi centrifugado à 2.700 x g por 15 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno e adicionou-se 1 volume de isopropanol. Após 10 minutos a temperatura ambiente, o DNA foi precipitado por centrifugação à 7.000 x g à 4 °C por 30 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de TE contendo RNase A 10 µg/mL e incubado por 30 minutos à 37°C. A solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e adicionou-se 1 Vol de uma solução de PEG 6.000 13% / NaCl 1,6 M. O DNA foi precipitado por centrifugação à 14.000 x g por 25 minutos, a temperatura ambiente.

O precipitado foi finalmente ressuspenso em 500  $\mu$ L de tampão TE e à solução de DNA foi adicionado CsCl para uma concentração final de 0,78 g/mL, e brometo de etídio para uma concentração final de 10  $\mu$ g/mL. O material foi então homogeneizado, transferido para tubos de ultracentrifugação e centrifugado em rotor VTI 65.2 (Beckman) por 4 horas à 60.000 rpm ou por 20 horas à 45.000 rpm na ultracentrífuga L8-70M (Beckman), à 25°C e com aceleração 9 e desaceleração zero.

O DNA plasmidial na forma super-espiralada foi coletado com auxílio de seringa de 5 mL e o material foi transferido para tubos de polipropileno de 15 mL. O brometo de etídio foi removido por lavagens com solução saturada de 1-butanol (Merck). À fase aquosa foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto e o DNA foi precipitado por centrifugação à 2.200 x g por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi lavado com aproximadamente 5 mL de etanol 70% e submetido novamente à centrifugação nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido ainda mais uma vez. O DNA precipitado foi então seco a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e ressuspenso em PBS. A dosagem do DNA foi feita em espectrofotômetro na DO<sub>260</sub> e sua concentração foi ajustada para 3,0 mg/mL em PBS.

#### 3.11. Marcação de sondas radioativas.

Como sondas radioativas, utilizamos a fase de leitura aberta dos respectivos genes por nós obtido através da amplificação por PCR.

Para a marcação da sonda utilizamos o "Oligolabeling kit" (Amersham-Pharmacia Biotech). Brevemente, utilizamos aproximadamente 50 ng de DNA que deveriam estar contidos em 34 µL finais, completados com TE. O tubo contendo o DNA foi então aquecido à 100°C por 3 minutos e incubados no gelo por 2 minutos. Após uma breve centrifugação, adicionamos 10 µL de "reagent mix", 30 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham-Pharmacia Biotech), 1µL de enzima "klenow" e água até completar 50 µL finais. A mistura foi incubada à 37°C por 2 horas, quando foram então adicionados 5 µL de EDTA 0,2 M (Life Tehnologies).

A mistura foi passada por coluna de resina "ProbeQuant G-50" (Amersham-Pharmacia Biotech) para a eliminação dos nucleotídeos livres. A eficiênia de marcação foi medida contando-se 1  $\mu$ L da sonda (diluída em 2 mL de líquido de cintilação miscível, Instituto SARDI) em um contador de radiação beta (1600TR – PACHARD). Para uma melhor eficiênia, tentamos utilizar sempre sondas com contagens entre 1-10 x 10<sup>8</sup> cpm/µg.

#### 3.12. Hibridação de DNA das colônias transformantes.

As colônias transformantes obtidas foram inoculadas separadamente em placas de LB/Amp sólido e então incubadas por 16-18 horas em estufa apropriada à 37°C. Ao final deste período, foi feito uma réplica da placa em membrana de nitrocelulose Hybond-N (Amersham-Pharmacia). Brevemente, as membranas foram colocadas sobre a placa de LB/Amp contendo as colônias, e retiradas logo após as colônias terem grudado nas membranas. Estas então foram embebidas sobre papel de filtro 3M contendo soluções específicas de acordo com o que se segue: incubação por 15 minutos em solução SDS 1% (por 2 vezes), um minuto em solução NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M, 5 minutos em solução NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, e por fim um minuto em solução SSC 2X e EDTA 2 mM. Ainda úmidas as membranas, foi feito ligação cruzada entre a membrana e o DNA com 150 mJ (por 2 vezes) utilizando-se o aparelho "GS GENE LINKER - UV CHAMBER" (BioRad).

Estas membranas foram então incubadas por 2 horas à 42°C em solução de hibridação. Seguindo-se esta incubação, a sonda foi acrescentada ao tubo contendo as membranas, após ter sido aquecida à 95°C por 5 minutos e mantida em gelo por 2 minutos. A hibridização foi feita à 42°C por 20-24 horas.

As lavagens das membranas foram feitas da seguinte maneira: 30 minutos à 42°C com SSC 2X e SDS 0,1% (por 2 vezes), e 30 minutos à 55°C com SSC 0,5 X e SDS 0,1% (por 2 vezes).

As membranas foram expostas a filmes de raio-X (Hyperfilm) durante 4-16 horas à -70°C.

Após revelação e por sobreposição dos filmes à placa de LB/Amp, foram identificadas as colônias que possuíam o inserto desejado.

# 3.13. Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose.

Os plasmídios purificados foram digeridos com diversas enzimas de restrição sozinhas ou em combinação. Uma µg de DNA foi digerida com 5 U da enzima de restrição na presença de tampão adequado (1X), à 37 °C por 2-16 horas.

Moléculas de DNA íntegras ou digeridas por enzimas de restrição foram submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1 X à 80V por 30 minutos. Como referência, utilizou-se os fragmentos do bacteriófago  $\lambda$  digerido com a enzima *Hind*III. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após a adição de tampão de amostra para eletroforese de DNA. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com filme Polaroid 667 (Polaroid).

#### 3.14. Seqüenciamento dos clones recombinantes.

Os plasmídios purificados foram seqüenciados através de seqüenciamento automático utilizando o "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin-Elmer) no seqüenciador ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer).

Os oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento foram: T7, 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (específico para o promotor T7) e U19, 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3' (específico para a seqüência universal de fago M13), além daqueles descritos na tabela 2, para completar o sequenciamento dos genes *leif* e *lbsti1*.

As reações de seqüenciamento foram feitas da seguinte maneira: em um tubo de 200  $\mu$ L (Perkin-Elmer) acrescentou-se 2  $\mu$ L da solução "BigDye Terminator" (Perkin-Elmer), 1  $\mu$ L do oligonucleotídeo específico (1,6 pmol) e 2  $\mu$ L plasmídio recombinante a ser seqüenciado (na concentração de 300-750 ng). Os tubos foram então levados ao termociclador 2400 (Perkin-Elmer) e a reação de PCR foi feita da seguinte maneira: 96 °C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 96

°C por 20 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos. Os tubos foram mantidos à 4 °C até o DNA ser precipitado acrescentando-se 100  $\mu$ L de etanol 80% gelado, e incubando-se por 30 minutos à 4 °C. Os tubos foram centrifugados à 12.500 x g por 20 minutos à 4 °C e os sobrenadantes foram desprezados. A lavagem foi feita acrescentando-se 200  $\mu$ L de etanol 70% gelado e homogeneizando-os. Seguiu-se mais uma centrifugação à 12.500 x g por 10 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi desprezado. A mesma lavagem foi repetida ainda uma vez e os tubos foram secos à 37 °C por 1 hora. Acrescentou-se então a cada tubo 2,5  $\mu$ L de tampão de amostra para gel de seqüenciamento. Os tubos foram incubados à 60 °C por 10 minutos e homogeneizados por 5 minutos. Imediatamente antes da aplicação no gel de seqüenciamento, as amostras foram desnaturadas em termociclador por 2 minutos à 90 °C e conservadas no gelo até o momento da aplicação.

Para cada gel de seqüenciamento utilizaram-se 9 g de uréia (Life Technologies), 2,5 mL da solução "LongRanger Solution" (FMC), 2,5 mL de TBE 10 X e 13 mL de água Milli Q. Esta solução foi agitada por 30 minutos enquanto as placas para fazer o gel foram montadas segundo a descrição do fabricante (Perkin-Elmer). Antes do gel ser aplicado, acrescentou-se 125  $\mu$ L de persulfato de amônio 10% (Sigma) e 17,5  $\mu$ L de TEMED (Sigma). Rapidamente a solução foi homogeneizada e aplicada entre as placas de vidro com o auxílio de uma seringa e de um filtro de 0,22  $\mu$ m (Costar). O tempo de espera para a polimerização do gel foi de 2 horas, após isto o gel foi colocado no aparelho de seqüenciamento. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1 X por 7 horas, como descrito no manual do aparelho. As seqüências foram analisadas utilizando o pacote de programas DNASTAR versão 5.0 (DNASTAR, Inc.).

#### 3.15. Análise computacional das seqüências obtidas.

Todos os clones obtidos e seqüenciados foram analisados utilizando-se o pacote DNASTAR versão 5.00 (DNASTAR Inc.). As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos destes genes foram alinhadas utilizando-se o alinhamento Clustal W. Os valores das porcentagens de identidade das sequências preditas de aminoácidos foram obtidos após as sequências obtidas serem submetidas a uma análise comparativa no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nhi.gov/BLAST).

Para a montagem das figuras foi utilizado o programa GENEDOC versão 2.5 (Nicholas & Nicholas, 1997).

# 3.16. Obtenção de formas amastigotas de L. (V.) braziliensis.

Para obtermos formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, macrófagos de medula óssea de camundongos foram cultivados e infectados com formas promastigotas do parasita.

A extração da medula foi feita utilizando-se fêmures dos camundongos, que após a extração sob condições estéreis, foram lavados com solução de Hank's (Sigma), e as epífises cortadas. Com o auxílio de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de insulina (13/8) foi passado de 3 a 4 mL de Hank's por fêmur. As células foram recolhidas em tubos e incubadas em gelo. Com auxílio de pipeta Pasteur foi homogeneizada a suspensão de células, e centrifugada para troca de meio. Foi colocada uma proporção de 1 fêmur por cada placa microbiológica. Então foi adicionado 10 mL de meio de diferenciação para cada placa e deixadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 dias foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas (13 mm) estéreis. Para o plaqueamento, todo o meio foi retirado e as placas lavadas duas vezes com 10 mL de Hank's gelado, e então colocado 10 mL de Hank's e deixadas de 30 minutos até 1 hora à 4 °C. As células foram removidas utilizando-se seringa de 10 mL acopladas a agulha grossa. Estas

foram centrifugadas por 10 minutos, à 2.000 x g, à 4° C. Em seguida, ao precipitado foi adicionado um volume menor de Hank's, onde as células foram contadas e ajustadas para 5 x  $10^6$  por poço, de placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm para aproximadamente 0,5 mL/poço. Um mL de meio de manutenção foi adicionado e as células foram deixadas aderindo a lamínula por uma noite, à  $37^{\circ}$ C e 5% de CO<sub>2</sub>.

macrófagos foi feita em lamínulas com formas A infecção dos promastigotas de L. (V.)braziliensis, numa concentração de 10:1 (parasitas:células), e incubada à 33 °C, por 24 horas, em seguida as lamínulas foram lavadas em PBS para remover os parasitos que estavam no sobrenadante, e após 24 horas de nova incubação como descrito acima, as lamínulas foram lavadas em PBS, 3 vezes, e fixadas com solução de paraformaldeído à 3,5%.

# 3.17. Obtenção de RNA de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*.

Para a extração de RNA das formas promastigotas e amastigotas de *L.(V.) braziliensis* utilizou-se o reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, cerca de  $5 \times 10^8$  parasitas foram lavados, centrifugados e ressuspensos em 250 µL de PBS e depois foram acrescentados 750 µL do reagente TRIzol. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a dissociação de complexos núcleoproteicos. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada 750 µL de TRIzol. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12.500 x g por 15 minutos à 4 °C. A fase aquosa foi retirada e transferida para tubos novos. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico para cada 750 µL de TRIzol, e as amostras foram incubadas por 16-20 horas à -20 °C. Seguiu-se centrifugação à 12500 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente à 12.500 x g por 5 minutos à 4 °C. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 15-20 minutos, e dissolvido em água livre de contaminação com RNAse. A concentração de RNA foi estimada em espectrofotômetro (HITACHI) a DO<sub>260nm</sub>.

Também foi utilizado RNA de formas promastigotas de *L. (L.) major*, e de macrófagos não infectados, seguindo-se os mesmos protocolos como descrito para *L. (V.) braziliensis*.

#### 3.18. Eletroforese de RNA.

Os RNAs obtidos foram separados por eletroforese utilizando-se géis de agarose/formaldeído.

Brevemente, para cada gel utilizou-se 1g de agarose fervida em presença de 84,6 mL de água livre de RNAse. Quando a temperatura dos géis alcançou 50-55 °C, 10 mL de MOPS 10X (Sigma), 5,4 mL de formaldeído 37% (Merck) e 2,5  $\mu$ L de uma solução de brometo de etídio (10 mg/mL, Invitrogen) foram adicionados. O gel foi então vertido sobre um suporte e esperou-se que o mesmo solidificasse.

Enquanto ocorria a polimerização do gel, as amostras de RNA foram preparadas como descrito a seguir. Para cada 10  $\mu$ g de RNA foram adicionados 20  $\mu$ L de um tampão de amostra contendo a seguinte mistura: 50  $\mu$ L de MOPS 10X, 250  $\mu$ L de formamida (Invitrogen) e 90  $\mu$ L e formaldeído 37%. As amostras foram incubadas à 70 °C por 60 minutos e colocadas imediatamente no gelo por mais 2 minutos. Em seguida foram acrescentados a cada amostra, 2  $\mu$ L de tampão de amostra para géis de DNA e as amostras foram aplicadas nos géis de agarose. Como tampão de corrida utilizou-se MOPS 1X. As amostras foram corridas por cerca de 45 minutos à 80 V.

#### 3.19. Transferência de RNA para filtros de náilon.

A transferência dos RNA separados por eletroforese para membranas de náilon (Amersham-Pharmacia Biotech) foi realizada utilizando-se o sistema "VacuGene XL" (Amersham-Pharmacia Biotech) com vácuo entre 60 e 70 psi. Os géis depositados sobre as membranas foram colocados sobre a placa porosa do aparelho e foi feito vácuo de acordo com as instruções o fabricante. Durante a transferência, os géis foram tratados com SSC 20 X por 4 a 4,5 horas.

Após a transferência, as membranas foram colocadas úmidas no aparelho "GS GENE-LINKER UV CHAMBER" (BioRad) e submetidas à 150 mJ, por 2 vezes.

# 3.20. Hibridação das membranas contendo os RNAs das diferentes formas de *Leishmania*.

As membranas de náilon contendo os diferentes RNAs das diferentes formas de *L. (V.) braziliensis* foram incubadas por 2 horas à 42 °C em solução de hibridação contendo os seguintes componentes: SSC 5X, Denhardt's 5X, DNA de esperma de salmão 100  $\mu$ g/mL (Sigma), tRNA 10  $\mu$ g/mL (Sigma) e formamida 50%. Seguindo-se esta incubação, as sondas foram acrescentadas após terem sido aquecidas à 95 °C por 5 minutos e mantidas em gelo por 2 minutos. As hibridações foram feitas à 42 °C por 16-20 horas.

As lavagens foram feitas da seguinte maneira: 30 minutos à 42 °C com SSC 2 X e SDS 0,1%, e 20 minutos à 50 °C com SSC 0,5 X e SDS 0,1% (2 vezes).

As membranas foram expostas à filmes "Hyperfilm" (Amersham-Pharmacia) por 16-20 horas à -70 °C.

# 3.21. Subclonagem dos genes no vetor de expressão em células procarióticas pHIS.

O vetor pHIS Paralelo 1 [PET-22b(+)] foi obtido em nosso laboratório por intermédio do Dr. Peter Sheffield ("University of Virginia, USA"). A clonagem neste vetor permite a geração de uma proteína em fusão com uma sequência de histidinas na porção amino-terminal da mesma. Desta forma, todos os insertos foram clonados de modo que ficassem em fase com a sequência de histidinas.

Uma vez que nós possuíamos os genes *lack*, *tsa*, *leif* e *lbsti1* de *L*. (*V*.) *braziliensis* clonados no vetor pMOS, nós os subclonamos no vetor pHIS.

Para tanto, os plasmídios foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição utilizadas nos oligonucleotídeos de amplificação, assim como o vetor pHIS. Os fragmentos de interesse foram separados em géis de agarose e purificados.

Os DNAs obtidos foram dosados e feitas as ligações utilizando a enzima T4 DNA ligase. Geralmente foi considerado uma proporção molar de 4:1 entre inserto:vetor e utilizado cerca de 200 ng de vetor em cada ligação, seguindo a seguinte fórmula:

 $\frac{\text{tamanho do inserto (pb) X quantidade do vetor}}{\text{tamanho do vetor (pb)}} X \frac{4}{1} = \text{quantidade do inserto (ng)}$ 

As ligações foram feitas à 15°C durante 16-18 horas e as transformações foram feitas em bactérias DH5 $\alpha$  (Life Technologies).

As colônias transformantes obtidas foram analisadas através do método de hibridização com sonda radioativa e por digestão enzimática.

Deste modo, os plasmídios pHIS-LACK, pHIS-TSA, pHIS-LeIF e pHIS-LbSTI1 foram obtidos.

# 3.22. Expressão e purificação das proteínas recombinantes codificadas pelos plasmídios obtidos.

#### 3.22.1. Expressão das proteínas recombinantes.

Para a expressão das proteínas codificadas pelos plasmídios obtidos a partir da clonagem no vetor pHIS, bactérias *E. coli* da cepa BL-21 (Novagen) foram transformadas.

Uma colônia transformante de cada plasmídio foi incubada em 5 mL meio de cultura 2-YT/Amp por 16-18 horas à 37°C sob agitação constante. Após este período o meio de cultura contendo as bactérias foi diluído 1:100 em meio 2-YT/Amp, e posta para crescer novamente sob agitação constante à 37 °C até que a DO<sub>560nm</sub> atingisse um valor em torno de 0,3. Quando esse valor era atingido, às bactérias era adicionado IPTG 0,1 mM (Life Technologies) e incubadas à 37°C sob agitação constante até DO<sub>560nm</sub> de 1,3-1,9, para que ocorresse a síntese da proteína recombinante de interesse.

Em seguida as bactérias foram incubadas no gelo por 15 minutos, e centrifugadas à 7.500 x g por 15 minutos à 4 °C. O precipitado foi então ressuspenso em solução "Tampão de Ligação". Então foi acrescido 0,3 mg de lisozima (Sigma) por tubo. Este foi incubado à 4°C por 30 minutos sob agitação constante. Este precipitado ressuspenso foi sonicado da seguinte forma: 4 ciclos de 30 segundos cada, potência 15%. Em seguida foi realizado uma centrifugação à 12.000 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado 200 µL de solução CHAPSO, a fim de lavá-lo. Este foi então homogeneizado a alta rotação e centrifugado à 14.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Este passo foi repetido por mais 2 vezes. Os sobrenadantes das lavagens foram recolhidos em tubos separados e ao precipitado foi adicionado de ligação (Vol/Vol) contendo uréia 8 M (Sigma), sendo então homogeneizado novamente a alta rotação e incubado por 2-24 horas a

temperatura ambiente sob agitação constante. Seguiu-se mais uma centrifugação à 14.500 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram recolhidos e guardados à 4°C, quando então as amostras foram purificadas.

#### 3.22.2. Purificação das proteínas recombinantes em coluna de afinidade.

Para a purificação, foi utilizada coluna de afinidade contendo resina de níquel 50% "Ni-NTA SuperFlow" (Qiagen). Brevemente, 20 mL da proteína solubilizada foi homogeneizada a 5 ml de resina, por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante, em seguida a amostra foi passada pela coluna por 2 vezes, a fim de que a cauda de histidina presente na proteína recombinante se ligue às microesferas de níquel, por afinidade. Então a coluna foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem. A eluição da proteína da coluna foi feita utilizando-se o tampão de lavagem em pH 6,3 acrescido imidazol 100 mM (Sigma). Diversas frações foram coletadas e incubadas a 4 °C até a diálise, que foi feita em 1 L de solução Tris-HCl 10 mM pH 8,0, por um período de 4 horas, e outro de 16-18 horas em nova solução, ambas à 4 °C.

#### 3.22.3. Purificação das proteínas recombinantes em gel SDS-PAGE.

Esta purificação foi feita eluindo-se as proteínas diretamente dos géis grandes de poliacrilamida. Para tanto, vários géis de poliacrilamida a 12%, foram submetidos a eletroforese à 120 V por 3-4 horas em cubas de acrílico próprias para géis grandes. Após a eletroforese os géis foram corados em uma solução gelada de KCl 250 mM. A banda correspondente à proteína recombinante foi então removida e feita em várias tiras, quando então foram colocadas em tubos de 50 mL (Falcon) contendo cerca de 10-15 mL de água bidestilada. Estes tubos foram incubados a temperatura ambiente e sob agitação constante por cerca de 24 horas. A proteína eluída na água foi então concentrada com auxílio do aparelho "Hetovac" (Heto, Scandinavia) e dosada novamente por diluição seriada em géis de poliacrilamida, tendo por controle quantidades conhecidas de BSA (Sigma).

Para remover o SDS presente nas amostras de proteína, as mesmas foram submetidas à diálise contra quatro litros de PBS (quatro trocas de um litro) à 4 °C durante 48 horas.

# 3.23. Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração ou transferência para filtros de nitrocelulose.

No caso das proteínas recombinantes, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética de 150 V por 1 hora em gel SDS 12% para separação, e 3% para empilhamento (Laemmli, 1970), em tampão de corrida apropriado.

Após a eletroforese, os géis foram corados com uma solução azul de Commassie ou as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, para posterior "Western Blot", em tampão apropriado.

A coloração em solução azul de Comassie foi feita por 20 minutos, ao final dos quais os géis foram transferidos para uma solução descorante por cerca de 1-2 horas. Após este tempo, os géis foram transferidos para uma solução de ácido acético 0,2 % onde permaneceram até que estivessem bem descorados. A secagem dos mesmos foi feita colocando-se os géis sobre papel de filtro 3M e em seguida colocados no aparelho secador de gel "SLAB Gel Dryer" (Hoefer, Pharmacia Biotech) por 40 minutos à 80°C.

A transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose foi feita em tampão de transferência por 1 hora à 100 V (Towbin *et al.*, 1979). As membranas foram coradas em solução corante "Ponceau-S", a descoloração foi feita com água bidestilada e a mobilidade das proteínas usadas como referência de massa molecular foi marcada na membrana.

# **3.24.** Clonagem do epítopo reconhecido por linfócitos T CD4<sup>+</sup> em vetor para expressão em células procarióticas, pGEX-4T1.

Como descrito por Launnois *et al.*, 1997, o gene *lack* possui em sua sequência de aminoácidos um peptídeo reconhecido por linfócitos T CD4<sup>+</sup>

compreendido entre os aminoácidos 156-173 (ICFSPSLEHPIVVSGSWD). Baseado nesta seqüência foram feitos oligonucleotídeos de sequências 5'- <u>GAT</u> <u>C</u>CG CCG TCG CTG GAA CAC CCG ATC GTG GTG TC GGC AGC TGG GAT –3' (senso) e 5'- <u>AAT TA</u>T CCC AGC TGC CGG ACA CCA CGA TCG GGT GTT CCA GCG ACG GCG -3'(antisenso), que codificam para a sequência de aminoácidos SLEHPIVVSGSW. Estes oligoucleotídeos foram anelados e inseridos no vetor pGEX4T previamente digerido com as enzimas *Bam*H I e *Eco*R I. O vetor pGEX4T codifica para a proteína GST a qual auxilia a purificação da proteína recombinante. A transformação da ligação em bactérias competentes DH5 $\alpha$ , foi feita conforme já descrito. A clonagem foi verificada através de técnicas de hibridização com sonda radioativa.

A hibridização das membranas de nitrocelulose contendo DNA das colônias transformantes resultantes da fusão do epítopo para linfócito T CD4<sup>+</sup> com o gene que codifica para GST (GST-EpLT) foi feita como descrita para o gene *lack* clonado no vetor pcDNA3, com exceção da solução de hibridação, que é a seguinte: SSC 6X, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0, 0,2% leite em pó (Molico) e água suficiente para 50 ml. Os processos de lavagem da sonda, exposição ao filme de raio-X e revelação deste filme foram feitos como descrito.

A presença desta seqüência foi posteriomente confirmada pelo sequenciamento do clone utilizando oligonucleotídeo específico ("5' pGEX sequencing primer", Amersham-Pharmacia Biotech).

#### 3.25. Expressão e purificação da proteína recombinante GST-EpLT.

Após transformação do plasmídio pGEX-EpLT em bactérias competentes DH5 $\alpha$ , uma colônia transformante foi semeada em meio de cultura LB/Amp por 16-18 horas à 37°C sob agitação constante. Numa diluição de 1:100, estas bactérias foram inoculadas novamente em meio LB/Amp até DO<sub>600nm</sub> atingir cerca de 0,6-0,8, quando então foi adicionado IPTG 0,1 mM, e incubadas novamente por mais 4 horas à 37°C sob agitação constante. Estas foram centrifugadas à 5.000 x g
por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado cerca de 10 ml PBS/Triton X-100. Este foi incubado no gelo por 15 minutos. A solução obtida foi transferida para tubos de congelamento (Nalgene) onde foram incubados em nitrogênio líquido por 1 minuto e em seguida incubado em água morna (50°C) até descongelamento e liquefação, sendo este passo repetido por mais 2 vezes. A amostra obtida foi então passada 10 vezes em seringa de 20 mL com agulha 25x7 mm. O material foi centrifugado à 1.000 x g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para matriz de glutationa (51 mg de glutationa e 10 ml de água autoclavada, previamente preparados) e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação constante. Esta foi então cetrifugada à 400 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi guardado enquanto o precipitado foi lavado em 10 ml PBS por 5 vezes, seguindose uma centrifugação à 1.200 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. Para obter a primeira eluição, foi acrescentado ao precipitado das lavagens 1,5 ml da solução de eluição (Tris-HCl 1 M pH 8,0, NaCl 5 M, 40 mg glutationa reduzida (Sigma), e água suficiente para 5,2 ml) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação constante, quando então foram centrifugados à 1.200 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi tratado nas mesmas condições a fim de se obter as eluições de 2 a 4. As eluições 1 e 2 foram dialisadas em 1 L de PBS 1X, por 4 horas à 4°C, e novamente por 16-18 horas em nova solução PBS 1X.

A respectiva proteína recombinante foi analisada em gel SDS-PAGE a 12%, como já descrito.

# 3.26. Subclonagem dos genes no vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3.

O plasmídio pcDNA3 comercialmente disponível (Invitrogen) foi utilizado como o vetor de expressão em células eucarióticas.

Uma vez que nós possuíamos os genes *lack*, *tsa*, *leif* e *lbsti1* clonados no vetor pMOS, nós os subclonamos no vetor pcDNA3.

Para tanto, os plasmídios foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição utilizadas nos oligonucleotídeos de amplificação. Os fragmentos de interesse foram separados em géis de agarose e purificados.

Após a purificação, os DNA foram dosados e feitas as ligações utilizando a enzima T4 DNA ligase como já descrito. Geralmente foi considerado uma proporção molar de 7,5:1 entre inserto:vetor e utilizamos cerca de 200 ng de vetor em cada ligação. As ligações foram feitas à 15 °C durante 16-18 horas e as transformações foram feitas em bactérias DH5 $\alpha$ .

As colônias transformantes obtidas foram analisadas através do método de hibridação com sonda radioativa e por digestão enzimática.

Deste modo, os plasmídios p-LACK da espécie *L. (V.) braziliensis* foi obtido. Este plasmídio foi posteriormente utilizado nos protocolos de imunização.

Os plasmídios pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF e pIgSP-LbSTI1da espécie *L. (V.) braziliensis* foram obtidos inserindo-se a seqüência de nucleotídeos codificando para o peptídeo sinal da cadeia  $\kappa$  da imunoglobulina de camundongo (IgSP), em fase com a porção 5' dos genes de interesse. Para a obtenção do gene que codifica para o IgSP, seis oligonucleotídeos baseados na seqüência descrita por Ishioka *et al.* (1999) foram gerados. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados foram as seguintes:

IgPS 1 (Foward): 5'-GCCGCCACCATGGGAATGCAGGTGCAGATC-3';

IgPS 2 (Foward): 5'-CAGAGCCTGTTTCTGCTCCTCTGTGGGTG-3';

IgPS 3 (Foward): 5'-CCCGGGGTCCAGAGGA<u>GGTAC-</u>3';

IgPS 1 (Reverse): 5'-TCCCATGGTGGCGGC<u>GTAC-</u>3';

IgPS 2 (Reverse): 5'-CAGAAACAGGCTCTGGATCTGCACCTGCAT-3';

IgPS 3 (Reverse): 5'-CTCCTCTGGACCCGGGCACCCACAGGAGGAG-3'.

Os nucleotídeos sublinhados se encaixam no sítio de *Kpn*I presente no vetor. O produto anelado foi subclonado no sítio *Kpn*I do vetor pcDNA3, gerando

o vetor pIgSP. Os genes foram posteriormente clonados nos respectivos sítios utilizando-se as enzimas de restrição contidas na sequência oligonucleotídica utilizada para amplificação dos genes por PCR.

A presença correta dos peptídeos sinais foi posteriormente confirmada pelo seqüenciamento direto dos plasmídios utilizando-se o oligonucleotídeo T7 presente na região 5' do vetor pcDNA3.

Estes plasmídios foram posteriormente utilizados nos protocolos de imunização.

### 3.27. Imunização com DNA recombinante.

Camundongos BALB/c, C57BL/6 e hamsters Golden foram utilizados em experimentos de imunização.

Antes de cada imunização por via i.m., os animais tinham suas patas traseiras depiladas para permitir a melhor visualização do músculo *Tibialis anterioris*, que era utilizado como alvo.

Cinco dias antes da primeira imunização, os animais recebiam cardiotoxina (Sigma) em uma dose i.m. de 10 mM dissolvida em 50 µl de NaCl 0,9% estéril.

Cinqüenta µg de DNA/perna traseira dissolvidas em PBS foram inoculadas em cada animal com o auxílio de seringas de insulina U-100 e agulhas de calibre 30 G (Becton-Dickinson). Um pequeno pedaço de ponteira amarela era adaptado à agulha, de modo que apenas 2-3 mm da ponta ficasse protuberante. Durante a administração do DNA, a agulha era mantida perpendicular ao músculo do animal.

Foram administradas 3 doses com intervalos de 2-3 semanas. Uma semana após a inoculação da última dose de DNA, os animais sofriam sangria, onde cerca de 100  $\mu$ L de sangue era retirado, incubado a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida centrifugado à 8.000 x g por 8 minutos a temperatura ambiente. Deste foi obtido o soro sanguíneo que foi estocado à -20°C para posterior análise se fosse o caso. No caso de imunização genética de camundongos C57BL/6 e BALB/c, por via i.d., na orelha dos mesmos, esta foi feita em 2 doses, com intervalo de 15 dias entre cada dose, numa quantidade de 100  $\mu$ g de DNA em um volume de 10  $\mu$ L. Foi utilizado para a imunização seringa de insulina de calibre 27.5 G e capacidade 0,3 CC (Becton Dickinson).

## 3.28. Imunização com proteína recombinante.

Grupos de camundongos BALB/c machos foram também imunizados com as respectivas proteínas recombinantes HIS-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1 purificadas como descrito.

Para experimentos de imunolocalização, cada animal recebeu 10  $\mu$ g de cada proteína emulsificada em ACF (vol/vol) e foi injetado 50  $\mu$ L/pata, por via i.d. Após 21 dias foi dada a segunda dose, utilizando-se AIF, e a administração foi feita na base da cauda dos animais. Após 15 dias foi feita a sangria destes animais, onde o soro foi obtido após centrifugação. O grupo controle foi imunizado com o adjuvante apenas, em PBS.

Para experimentos de proteção (desafio parasitário), camundongos BALB/c foram imunizados com 25  $\mu$ g das respectivas proteínas recombinantes. Foram 3 doses administradas, intraperitonealmente, com intervalos de 2 semanas entre cada dose. Estas imunizações continham também CpG ODN 1826 10  $\mu$ g/mL ("Coley Pharmaceuticals, Wellesley, MA, USA") e hidróxido de alumínio 2% (Alum) (Superfos Biosector, Dinamarca) (2,5  $\mu$ L/ $\mu$ g proteína recombinante). Os grupos controles foram imunizados com os adjuvantes apenas, em PBS.

# **3.29.** Experimentos de imunolocalização através de reações de imunofluorescência indireta (IFI) e microscopia ConFocal.

Formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas nestes experimentos.

Formas promastigotas, obtidos de cultura in vitro dos parasitas, foram lavados em PBS e fixados em uma solução de paraformaldeído 3,5% por aproximadamente 30 minutos, a temperatura ambiente, e lavados por mais duas vezes com PBS. Após a fixação, 20 µL da solução de parasitos (cerca de 40-50 parasitos por campo) foram colocados sobre os poços demarcados nas lâminas para imunofluorescência (Glasstécnica) e deixados secar a temperatura ambiente. As lâminas contendo os parasitas foram estocadas à -20 °C. Posteriormente, os pocos foram bloqueados com PBS contendo BSA 1% (PBS-BSA) por 30 minutos e depois incubados com o conjunto de soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes (diluídos 1:50 e 1:100), por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS-T20 0,01% e depois de secá-las foram adicionados o conjugado, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Sigma) diluído 1:50 em PBS-BSA, e solução de DAPI na diluição de 1:100, e foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em PBS-T20 0,01% e depois de secas montadas com lamínulas na presença de glicerina tamponada. As formas promastigotas foram observadas em microscópio de fluorescência, objetiva 40X e 100 X (Optishot-2 fluorescence, Nikon).

Formas amastigotas foram obtidas como descrito. Estas foram fixadas com solução de formaldeído 3,5 % durante 1 hora e em seguida lavadas em PBS e depois adicionados 500 µL de solução de PBS contendo 1% de saponina e 1% de azida. Após 40 minutos de incubação esta solução foi removida e foram adicionadas às células um conjunto de soros humanos de pacientes com

leishmaniose mucocutânea, na diluição de 1:100, que foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente (o soro foi diluído em solução de PBS com BSA 2%). Depois de novas lavagens em PBS, as células foram incubadas com conjugado, anti-IgG humana marcado com FITC (Sigma) na diluição de 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente (o conjugado foi diluído em solução de PBS com 2% de BSA). Seguida de uma nova etapa de lavagens das lamínulas em PBS foram adicionados os anticorpos policionais contra as proteínas recombinantes obtidas na imunização já descrita ( $\alpha$ -LACK,  $\alpha$ -TSA,  $\alpha$ -LeIF,  $\alpha$ -LbSTI e  $\alpha$ -CFA). Os soros foram diluídos à 1:100 em PBS com BSA 2% e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. O conjugado anti-IgG de camundongo marcado com CY3 foi adicionado após lavagens das lamínulas com PBS, na diluição de 1:100. Neste momento, foi adicionada a solução de DAPI na diluição de 1:100 e nova incubação de 1 hora a temperatura ambiente foi realizada. Após lavar as lamínulas em PBS, elas foram montadas sobre lâminas de vidro em solução de glicerina tamponada e vedadas com esmalte. As imagens de macrófagos infectados com formas amastigotas foram adquiridas com microscópio Zeiss Axiovert acoplado ao microscópio confocal (BioRad 1024UV), usando 61X 1.4 (abertura) com interferência de contraste diferencial, objetiva PlanApo.

## 3.30. Ensaios de "Western blotting" para detecção de anticorpos.

As membranas de nitrocelulose foram produzidas como descrito, e foram bloqueadas em uma solução de PBS/leite-BSA durante 2 horas a temperatura ambiente ou por 16 horas à 4°C.

Em seguida, as membranas foram incubadas com solução de PBS/leite-BSA contendo os anticorpos produzidos pelos animais imunizados diluídos adequadamente (1:200) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, foram feitas três lavagens de 10 minutos cada em PBS-T20 0,05% e incubação com PBS/leite-BSA contendo o conjugado (anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase) na diluição de 1:1.000 por mais 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-T20 0,05% por 10 minutos cada lavagem. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência utilizandose os reagentes do sistema ECL (Amersham) e, depois, em solução de PBS (35 ml) contendo DAB (10 mg; Sigma) e  $H_2O_2$  30% (10 µL; Merck). A reação foi interrompida pela adição de água destilada após a visualização das bandas.

## 3.31. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos.

## 3.31.1. ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG.

O ELISA para a detecção dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foi realizado como descrito abaixo.

a) Preparo dos Soros:

Amostras de sangue dos animais foram obtidas e processadas deixando-as por 16 a 18 horas a temperatura ambiente. Seguiu-se então uma centrifugação à 2.200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Os soros foram então separados e armazenados em tubos de 500  $\mu$ L à -20 °C.

b) Sensibilização das Placas:

Foram utilizadas placas de ELISA ("Covalent binding surface", Costar). Foram adsorvidos a cada poço, 5  $\mu$ g/mL da proteína recombinante de interesse diluído em tampão carbonato. As placas foram então deixadas a temperatura ambiente de 16 à 18 horas e posteriormente lavadas por três vezes em solução de PBS-T20.

c) Reação Imunoenzimática:

Cada poço foi bloqueado com 100  $\mu$ L da solução de PBS/leite-BSA durante 2 horas à 37°C. Em seguida, incubava-se a placa por 1 hora com 100  $\mu$ L dos soros (diluídos em PBS/leite-BSA) em diluições seriadas (fator de diluição 2). O conteúdo dos poços foi desprezado e as placas foram lavadas por 3 vezes em PBS-T20. Cada poço foi incubado com 50  $\mu$ L de uma solução de PBS/leite-BSA contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (KPL) diluída na proporção de 1:4.000 por mais 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes em solução de PBS-T20. A cada poço foram então acrescentados 100  $\mu$ L do substrato preparado da seguinte maneira: 10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M pH 4,7, acrescido de 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50  $\mu$ L de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. As placas foram lidas à A<sub>492nm</sub> em leitor Multiskan MCC/ 340P (Titertek).

### 3.31.2. ELISA para a detecção de subclasses de imunoglobulinas.

A reação de ELISA foi feita como descrito no item acima. A única modificação feita foi a utilização de anticorpos anti-IgG1 ou IgG2a conjugados com peroxidase (ICN Biochemicals) diluídos na proporção de 1:1.000. As amostras utilizadas nos ensaios foram obtidas de um conjunto de soros dos animais imunizados.

### 3.32. Avaliação resposta imune celular, via produção de citocinas.

### **3.32.1. Produção de IFN-γ.**

Células esplênicas foram cultivadas em meio RPMI completo e as culturas foram mantidas à  $37^{\circ}$ C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram obtidas dos baços dos camundongos imunizados com os devidos plasmídios, sendo as hemácias foram lisadas na presença de tampão ACK. As células foram então lavadas 3 vezes em meio RPMI, ressuspensas em meio completo e diluídas para uma concentração de  $20x10^6$  células/mL. O ensaio foi feito em placas de 96 poços (Costar), onde 200 µL da suspensão de células foi adicionado em cada poço, e os antígenos foram adicionados nas concentrações desejadas. As respectivas proteínas recombinantes foram adicionadas em

concentrações finais que variavam de 50 a 0,5  $\mu$ g/ml. IgG de rato e anticorpos monoclonais anti-CD4 (GK1.5) e anti-CD8 (2.43) foram adicionados em alguns poços na concentração de 10  $\mu$ g/mL. Depois de 5 dias em cultura, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de IFN- $\gamma$  foi determinada. Cada determinação foi feita em triplicata e os resultados estão apresentados como médias e desvio padrão (DP).

A concentração de IFN- $\gamma$  foi estimada por ELISA de captura da seguinte maneira: placas de 96 poços foram cobertas com 50 µL de tampão carbonato (pH 9,6) contendo 5  $\mu$ g/mL do anticorpo monoclonal anti-INF- $\gamma$  de camundongo R4-6A2 (Pharmingen). Após incubação durante a noite à 4°C, o anticorpo de captura foi removido por 3 lavagens em PBS-Tween 20 0,05%, e a placa foi bloqueada com 100 µL da solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado (Molico) e 2% de BSA (Sigma) (PBS-leite-BSA). Após duas horas de bloqueio, 50 µL da solução de bloqueio foram retirados e acrescentado mais 50 µL do sobrenadante de cultura. A curva padrão foi feita diluindo-se diferentes concentrações de IFN-y recombinante (25 a 0,195 ng/mL) em PBS-leite-BSA. As placas foram então incubadas durante a noite à 4°C e lavadas posteriormente por 5 vezes em PBS-T20. O anticorpo anti-IFN-γ biotinilado XMG1.2 (Pharmingen) foi adicionado na concentração final de 2,5 µg/mL em PBS-leite-BSA. Após incubação à 4°C durante a noite, as placas foram lavadas por 5 vezes em PBS-T20. Foi adicionado então 50 µL de PBS-leite-BSA contendo estreptavidina (Sigma) diluída na proporção de 1:500. Após 4 horas de incubação a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas em PBS-T20 por 5 vezes e a revelação foi feita como descrito. A concentração de IFN-y foi estimada pela interpolação em curvas realizadas em paralelo utilizando concentrações conhecidas da citocina recombinante.

### 3.32.2. Produção de IL-10.

A citocina IL-10 também foi dosada, seguindo-se a mesma metodologia utilizada para dosagem de IFN-γ, sendo utilizado anticorpo anti-IL-10 de camundongo (BD Biosciences), além de anticorpo anti-IL-10 biotinilado (BD Biosciences).

## 3.33. Experimentos de infecção em animais de laboratório.

## 3.33.1. Purificação de formas promastigotas metacíclicas.

A metodologia utilizada para purificação de formas metacíclicas de parasitas do gênero *Leishmania* foi seguida como descrito por Spath & Beverly, 2001. Brevemente, formas promastigotas provenientes de cultura axênica foram centrifugadas à 2.000 x g à 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitas ressuspensos em 2 mL de meio RPMI. Estes foram submetidos à um gradiente de Ficoll 20%:10% (1:1), como descrito abaixo, e novamente foram centrifugados à 500 x g à 4°C por 15 minutos. As primeira e segunda fases do sobrenadante foram recolhidas e então lavadas em meio RPMI nas mesmas condições descritas na primeira centrifugação. Os parasitas foram contados e a concentração desejada ajustada, e mantidos à 4°C até o momento da infecção.

O gradiente de Ficoll foi feito diluindo o mesmo em PBS à 20-30%, e mantido à 4°C, em condições estéreis. No momento de uso, o mesmo era ajustado em PBS para 10-15%. Em tubo Falcon de 15 mL foi adicionado cuidadosamente 2 mL de Ficoll à 20-30%, seguido de 2 mL de Ficoll à 10-15% recém-preparado, e por último 2mL de RPMI contendo os parasitas. As porcentagens de Ficoll utilizadas estão de acordo com o apropriado para cada parasita, no caso de *L. (L.) major* (cepa Friedlin) e *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez) era utilizado 10% e 20%, respectivamente.

### 3.33.2. Infecção dos animais com formas promastigotas de Leishmania.

Brevemente, os parasitos mantidos em M199/S foram crescidos até a fase de promastigotas metacíclicos (5-6 dias, fase estipulada previamente) e então contados em câmara de Neubauer, e a concentração ajustada para o desejado. Por vezes, estes parasitas foram purificados em gradiente de Ficoll, como descrito no ítem acima. Estes então foram lavados em PBS e ressuspensos em meio RPMI, estéreis. Com auxílio de seringa de insulina de calibre 27.5 G e capacidade 0,3 CC (Becton Dickinson), os parasitos foram injetados nas patas traseiras dos animais, por via s.c., num volume de 50 µL, e a evolução da infecção acompanhada através da medição da espessura das patas infectadas com auxílio de um paquímetro de leitura direta (Vernier Caliper, Mitotoyo). Por vezes, a infecção foi feita na orelha dos animais, por via i.d., num volume de 10 µL, como descrito por Belkaid *et al.*, 2000, sendo medido o tamanho da lesão formada com auxílio de paquímetro.

Camundongos BALB/c foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* (cepa Friedlin) ( $2x10^6$  promastigotas), por via s.c. Assim como hamsters Golden, que foram infectados com  $1x10^5$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa M2903).

Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $3x10^3$  formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (L.) major* (cepa Friedlin clone V1), por via i.d., assim como camundongos BALB/c que foram infectados com  $1x10^6$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez), ou  $1x10^5$  formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa BA788), por via i.d.

Quando necessário, os animais foram anestesiados em éter sulfúrico, no caso de infecções s.c., nas patas dos animais, ou com xilaína e ketamina, de acordo com as instruções do fabricante, quando a infecção era i.d., na orelha dos animais.

Quando sacrificados, os animais foram colocados em recipiente contendo éter sulfúrico ou clorofórmio embebido em algodão, ou sob alta concentração de CO<sub>2</sub>.

### **3.33.3.** Obtenção de parasitas a partir de tecidos infectados.

No caso de infecções com *L. (L.) major* (cepa Friedlin clone V1) e *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez), em camundongos, após determinado tempo de infecção, as orelhas infectadas foram seccionadas e embebidas em álcool 70%. De acordo com o descrito por Belkaid *et al.*, 1998, sob condições estéreis foram separadas as dermes ventral e dorsal. Cada lado dérmico foi depositado em meio RPMI contendo penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100  $\mu$ g/mL, e adicionado 50  $\mu$ g/mL de enzima liberase (Boehringer). Após incubação por 40 minutos à 37°C, o tecido dérmico foi dissociado em meio RPMI contendo 10% SFB e Dnase I 0,05% (Sigma-Aldrich), e o tecido macerado utilizando-se o aparelho "Medimachine" (BD Biosciences) por 3 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. Os homogenatos de tecido foram filtrados utilizando-se filtros de 70  $\mu$ m "cell strainer" (Falcon) e então centrifugados à 2.000 x g à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em meio apropriado, de acordo com o experimento a ser realizado em seguida.

Ao mesmo tempo das orelhas, os linfonodos de drenagem (retromaxilares) também foram obtidos e incubados nas mesmas condições que as células dérmicas. Então foram macerados em filtros de 70 µm "cell strainer" (Falcon) e centrifugados nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em meio apropriado, de acordo com o experimento a ser realizado em seguida.

No caso de infecções com *L. (V.) braziliensis* (cepa M2903) em hamsters Golden, após determinado tempo de infecção, sob condições estéreis, as patas infectadas eram lavadas com álcool iodado (Vol/Vol) e as lesões excisadas assim como os linfonodos de drenagem. Estes então eram macerados com auxílio de pistilo contendo PBS e brevemente filtrados em gaze. Logo após era feita uma centrifugação à 2.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspenso em PBS e novamente centrifugado à 40 x g por 5 minutos a temperatura ambiente.

### **3.33.4.** Quantificação de parasitas a partir de tecidos infectados.

Após os tecidos serem processados de acordo com o ítem acima, estes foram ressuspensos em 1 mL de meio 199, e 50  $\mu$ L destes foram diluídos 1:4 em placa de 96 poços contendo 50  $\mu$ L de meio NNN-10% sangue de cabra e 150  $\mu$ l de M199/S. Diluição seriada de 1:2 foi feita a partir do primeiro poço, para os poços seguintes contendo 100  $\mu$ L do meio. Após 1 semana de cultivo à 25°C, foi avaliado o último poço que ainda possuía parasitas e então feitos os cálculos da quantidade de parasitas no tecido macerado obtido, conforme descrito por Belkaid *et al.*, 1998. Todos os valores obtidos da quantidade de parasitas foram transformados em log antes da análise estatística ser conduzida.

# 3.34. Citometria de fluxo para marcadores de superfície celular a partir dos tecidos infectados.

Os tecidos após serem processados de acordo com o descrito, estes foram ressuspensos em 4% paraformaldeído e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos, quando então foram lavados por 2 vezes em PBS-BSA 0,2% e mantidos à 4°C até a preparação para o experimento de FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorting). Previamente à coloração as células foram centrifugadas à 500 x g à 4°C por 10 minutos, e então ressuspensas em 100  $\mu$ L de "FC block", e incubadas por 20 minutos à 4°C. Em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de PBS-10% SFB contendo 1:500 de anticorpo anti-TCR- $\beta$  conjugado a APC, 1:200 de anticorpo anti-CD4 conjugado a FITC, 1:500 de anticorpo anti-CD8 conjugado a CyC, e 1:500 de anticorpo anti-GITR conjugado a PE (BD Biosciences), 1:500 de anticorpo anti-GITR conjugado a PE (BD Biosciences), de acordo com o experimento, e então incubadas por 30 minutos à 4°C sob privação de luz. Após a incubação as células

foram lavadas por 2 vezes em PBS-10% SFB e ressupensas em 200 µL do mesmo, e incubadas à 4°C até a aquisição das mesmas.

Para a aquisição dos dados, as células foram ajustadas eletronicamente no próprio aparelho de citometria de fluxo (FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton Dickinson) e um mínimo de 100.000 células foram adquiridas. Os dados foram analisados utilizando-se o programa computacional CELLQuest<sup>TM</sup> (Becton Dickinson), sendo as células escolhidas primeiramente pela marcação em TCR-β e "Forward Scatter", e então em CD4-CD25 ou CD8-CD25.

## 3.35. Obtenção e infecção de células dendríticas derivadas de medula óssea.

As células dendríticas foram obtidas como já descrito, com exceção de ter sido utilizado GM-CSF (BD Biosciences), na cultura celular.

A infecção foi feita com formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (L.) major* (cepa Friedlin clone V1), numa proporção de 10 parasitas : 1 célula, por um período de 16-20 horas, à 37°C, quando então foi lavada a cultura, e as células aderentes foram obtidas com o auxílio de um raspador de células. Estas células foram contadas e mantidas à 4°C até o seu uso.

### 3.36. Citometria de fluxo para marcadores de citocinas intracelulares.

Para marcação de citocina intracitoplasmática foi seguido conforme descrito por Belkaid *et al.*, 2002, onde após incubação de 12-16 horas, às células dérmicas restimuladas com células dendríticas infectadas com *L. (L.) major*, foi adicionado Brefeldina A 10 µg/mL (Sigma), e então incubadas por um período de 4 horas, à 37°C, quando então foram fixadas em paraformaldeído. Seguiu-se incubação com "FC Block", com exceção de que foi utilizado para permeabilização, saponina à 0,1%. Para marcação de IFN- $\gamma$  foi utilizado anticorpo anti-citocina marcado com PE (BD Bioscienes), e utilizado numa diluição de 1:200.

### 3.37. Produção e Purificação de anticorpos monoclonais.

Hibridomas de células produtoras dos anticorpos isotipo (GL113) e anti-GITR (DTA-1) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Simon Sakaguchi ("Kyoto University", Kyoto, Japão).

A produção dos anticorpos monoclonais foi feita utilizando-se o kit "CELLine" (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, os hibridomas foram cultivados em frascos de cultura apropriados, e incubados à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, em meio RPMI contendo 10% SFB (GIBCO BRL). Gradativamente foi sendo substituído o meio acima por meio livre de soro ("Serum Free Medium", BD Biosciences) até 100% deste último. Neste estágio da cultura, 2x10<sup>6</sup> células/mL em 15 mL foram transferidas para frascos de cultura "CELLine", contendo 1L de meio livre de soro, quando então foi incubado à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 15 dias. Após este tempo, periodicamente a cada 5-7 dias, o sobrenadante da cultura foi recuperado e então armazenado à -80°C até a purificação dos anticorpos.

Para purificação dos mesmos, foi utilizado o método de sulfato de amônio. Brevemente, foi utilizado um volume de sulfato de amônio saturado, pH 7.2, estéril, utilizando-se a fórmula: Vol= Vol<sub>Anticorpo</sub>(0.45)/0.55. Após homogeneização do anticorpo à solução, este foi incubado a temperatura ambiente por 90 minutos, e então centrifugado à 2.000 x g, por 15 minutos e à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em solução PBS 1X, estéril. Este ressuspendido foi dialisado contra PBS 1X, por três vezes, em 1L, sendo 1 dia por diálise, à 4°C.

A quantificação do anticorpo foi feita por espectrofotometria à  $A_{280nm}$  e a D.O. obtida multiplicada por 0.801 chegando-se assim a concentração por mililitro de anticorpo. Este foi mantido à -20°C até sua utilização quando então era mantido à 4°C.

### **3.38.** Tratamento de animais com anticorpos monoclonais.

Camundongos foram tratados com os anticorpos monoclonais isotipo controle IgG2a ou anti-GITR. Brevemente, de 0,5 a 1 mg de anticorpo foi injetado intraperitonealmente por animal, nos tempos devidos.

## 3.39. Dosagem de citocina produzida por células de LN de drenagem.

Células do linfonodo de drenagem foram obtidas de acordo com o descrito, quando então foram ressuspensas em meio RPMI-10% SFB e contadas. Um número de  $6x10^6$  células/mL em 100 µL por poço foi utilizado, adicionando-se 1:1.000 de 2-ME (GIBCO BRL) e 1:100 SLA, num volume final de 200 µL. A cultura foi feita em triplicata, com e sem SLA, e incubada por um período de 48 horas, à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, quando então foi recolhido 150 µL do sobrenadante. As citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  foram dosadas como descrito.

### 3.40. Análise estatística.

Teste "One Way ANOVA" ou teste *t* de Student foram utilizados para comparar as possíveis diferenças nos valores das médias das concentrações de IFN- $\gamma$ , e/ou para a medida das lesões observadas nos diferentes grupos de animais, assim como para a comparação das DOs<sub>492</sub> obtidas nos ensaios de ELISA utilizando-se os soros dos animais imunizados nas diferentes formulações. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *p* era < 0,05.

4. Resultados

## 4.1. Identificação e caracterização de genes de L. (V.) braziliensis.

Baseando-nos em antígenos já descritos na literatura que foram capazes de gerar uma resposta imune específica e protetora em experimentos de imunização, contra infecção experimental com *L. (L.) major*, nós clonamos os genes de quatro antígenos de *L. (V.) braziliensis*, sendo eles: *lack* (receptor para proteína C quinase ativada), *tsa* (anti-oxidante tiol específico), *leif* (fator ribossomal de elongação e iniciação de *Leishmania*) e *lmsti1* (proteína 1 de estresse induzível de *Leishmania major*). Após a clonagem nós caracterizamos estes antígenos através de experimentos de sequenciamento de DNA, detecção de mRNA, além de experimentos de imunolocalização.

## 4.1.1. A sequência de DNA.

Para a obtenção da sequência de oligonucletídeos para amplificação por PCR, nos baseamos em sequências já depositadas no Banco de Genes ("GenBank"). O número de acesso para cada gene está mostrado na tabela 3. Com relação ao antígeno LACK, no momento em que estávamos clonando o seu gene, não havia nenhuma informação a respeito do mesmo, depositada no Banco de Genes, da sequência de *L. (V.) braziliensis*, o que nos levou a ter como base a sequência de *L. (L.) major* para confeccionarmos os respectivos oligonucleotídeos para amplificação por PCR, e o mesmo ocorreu para outros dois antígenos, TSA e LmSTI1. Já para o antígeno LeIF, a sequência deste gene de *L. (V.) braziliensis* já havia sido depositada no Banco de Genes, de onde nos baseamos.

Inicialmente, os genes foram clonados no vetor de clonagem "pMOS BLUE", e a sequência de aminoácidos foi predita utilizando-se programas computacionais, como descrito em Material e Métodos. **Tabela 3** – Número de acesso no Banco de Genes daqueles genes clonados de *L*. (*V.*) *braziliensis*, a partir das sequências depositadas da espécie *L*. (*L.*) *major*, com exceção do gene *leif*, como indicado.

Gene de Interesse	Número de Acesso	Referência Bibliográfica
lack	AF034804	Cheng <i>et al.</i> , 2001
tsa	AF069386	Levick et al., 1998
leif	A81464	Myler <i>et al.</i> , 1999
leif (L. (V.) braziliensis)	Q25225	Skeiky <i>et al.</i> , 1995
lmsti l	AAB37318	Web et al., 1996

Quando comparada a sequência deduzida de aminoácidos do gene *lack* de *L. (V.) braziliensis* à de *L. (L.) major* (Figura 3), verificamos haver alta identidade entre as mesmas (96%). Notamos que ocorreram 11 substituições de resíduos de aminoácidos, sendo 4 destas substituições conservadas, ou seja, não foi alterada a propriedade física do aminoácido, quanto a sua carga.

Quando comparada a sequência depositada no Banco de Genes de *L. (V.)* braziliensis, sendo a mesma cepa (MHOM/BR/75/M2903), também observamos haver uma alta identidade quanto à seqüência predita de aminoácidos quando comparada aquela clonada por nós (96%), havendo substituições de resíduos de aminoácidos de forma similar à observada em *L. (L.) major* (dados não mostrados).

Corroborando dados da literatura, nas quatro espécies de *Leishmania* analisadas (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*), observamos que o epítopo imunodominante para linfócitos T CD4<sup>+</sup> presente na sequência do antígeno LACK, se encontrava totalmente conservado em todas as espécies. Este epítopo compreende uma sequência de aminoácidos (156 a 173) reconhecida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos de MHC I-A<sup>d</sup> (BALB/c), já previamente descrito (Schilling & Glaichenhaus, 2001).

Com relação ao antígeno TSA de *L.* (*V.*) braziliensis por nós clonado, este apresentou um gene de 600 pb de acordo com o descrito para a espécie *L.* (*L.*) major (Webb et al., 1998). Quando a sequência deduzida de aminoácidos do gene por nós clonado foi comparada aquela previamente descrita de *L.* (*L.*) major, observamos haver uma identidade entre as sequências de 83%, com 32 substituições de resíduos de aminoácidos, sendo 17 destas substituições conservadas (Figura 4). Ainda, a sequência deduzida de aminoácidos mostrou ter dois resíduos invariáveis de cisteínas do gene, resíduos estes que medeiam a formação de dímeros, o que é importante para a atividade peroxidase relacionada à função do gene (Webb et al., 1998).

Com relação ao antígeno LbSTI1, a amplificação do mesmo por PCR apresentou um fragmento de DNA de peso molecular de 1,6 Kb, compreendendo a fase de leitura aberta para este gene, de acordo com o descrito para o mesmo gene da espécie *L. (L.) major* (Webb *et al.*, 1997). Para cobrir toda a fase de leitura do gene, novo oligonucleotídeo foi confeccionado (Tabela 2), baseado na sequência parcial até então obtida por sequenciamento.

A sequência deduzida de aminoácidos mostrou que as regiões amino e carboxi terminais são altamente conservadas entre as espécies L. (V.) braziliensis e L. (L.) major (Figura 5). Observamos haver 92% de identidade entre as sequências preditas de aminoácidos, contendo 42 substituições de aminoácidos, sendo 13 destas substituições conservadas. Interessantemente, a região que compreende os aminoácidos 166 a 193, mostrou ter várias substituições de resíduos de aminoácidos, sendo que apenas 3 aminoácidos são idênticos entre as duas espécies, enquanto 25 são diferentes, sendo que destes apenas 7 apresentam substituições conservadas, e ainda 2 aminoácidos na sequência de L. (V.) braziliensis são ausentes. Como descrito por Webb et al., em 1997, outros organismos apresentam as mesmas alterações nesta região que se apresentou variável, incluindo humanos, leveduras (Saccharomyces cerevisiae), soja (Glycine max), tripanosomatídeos (Trypanosoma cruzi e T. brucei), e outras espécies de Leishmania. Ainda, a sequência deduzida de aminoácidos mostrou conservar 6 motivos repetidos de TPR (tetra-trico-peptídeos), característica de proteínas que atuam como co-chaperonas.

Com relação ao antígeno LeIF, este havia sido clonado anteriormente a partir de *L. (V.) braziliensis* (Skeiky *et al.*, 1995), e mais tarde de *L. (L.) major* (Skeiky *et al.*, 1998). A comparação da sequência deduzida de aminoácidos mostrou ter alta identidade entre as cepas da mesma espécie (*L. (V.) braziliensis*), sendo aquela descrita na literatura e aquela por nós clonada, apresentando uma única substituição de aminoácido não conservada na posição 363 (dados não mostrados). Em comparação a espécie *L. (L.) major* a identidade foi de 98%, havendo 7 substituições de resíduos de aminoácidos, sendo 5 destas conservadas. A sequência deduzida de aminoácidos mostrou manter uma série de motivos conservados, previamente descritos, característica esta da família "DEAD box" de helicases de RNA (Skeiky *et al.*, 1998) (Figura 6).

## 4.2. Análise da expressão destes antígenos nas diferentes formas do parasita

### 4.2.1. Os transcritos de mRNA.

Para verificarmos se estes genes estavam sendo transcritos tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas de L. (V.) braziliensis, realizamos experimentos de "Northern Blot", a partir de mRNA isolado das respectivas formas. Para tanto, obtivemos parasitas de forma promastigota a partir de cultura axênica, e parasitas de forma amastigota a partir de macrófagos infectados in vitro, onde estes últimos foram então lisados para liberação das formas amastigotas. Pelos nossos resultados observamos que o gene *lack* apresentou um transcrito de aproximadamente 1,5 a 2,0 kb, o gene *tsa* um transcrito de aproximadamente 2,0 kb, o gene *leif* um transcrito de aproximadamente 2,5 a 3,0 kb, e o gene *lbsti1* um transcrito de aproximadamente 2,5 kb (Figura 7, de A a D). O tamanho dos transcritos por nós observados está de acordo com o tamanho previamente descrito na literatura, para a espécie L. (L.) major (antígenos: LmSTI1, Webb et al., 1997; LeIF, Skeiky et al., 1995; LACK, Gonzalez-Aseguinolaza et al., 1999; e TSA, Webb et al., 1998). Os transcritos obtidos, quando comparados aos transcritos de formas promastigotas de L. (L.) major (coluna 1 dos quadros da figura), mostraram apresentar hibridação no mesmo padrão eletroforético, tanto para as formas promastigotas quanto amastigotas de L. (V.) braziliensis analisadas.

O mRNA total dos parasitas e macrófagos hibridizou com a sonda de  $\alpha$ tubulina, com peso molecular aproximado entre 1,8 e 2,0 kb (Fong *et al.*, 1984 e Joshi *et al.*, 1995), e mostrou não haver diferença quanto a expressão do transcrito nas diferentes amostras utilizadas (Figura 7, em E).

### 4.2.2. A expressão protéica.

A fim de obtermos as proteínas recombinantes de cada gene, subclonamos os genes em vetor para expressão em células procarióticas, vetor PET-22b(+), contendo a sequência de DNA para uma cauda sextupla de histidina (pHIS).

Inicialmente, após indução bacteriana, as proteínas recombinantes expressas foram extraídas de acordo com suas solubilidades em tampão aquoso. As proteínas insolúveis (HIS-LACK, HIS-LbSTI1 e HIS-LeIF) foram extraídas em tampão contendo uréia 8M, após processo de sonicação e lavagem em detergente. Já a proteína recombinante HIS-TSA mostrou ser parcialmente solúvel quando extraída por sonicação em comparação a extração em ureía 8M (dados não mostrados).

Observamos que o padrão eletroforético de migração destas proteínas recombinantes em gel SDS-PAGE à 12%, sob condições denaturantes na presença do agente redutor 2-ME, apresentou-se como bandas únicas, com exceção da proteína HIS-LeIF, com seus respectivos pesos moleculares estando de acordo com o descrito na literatura (Mougneau *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998; e Skeiky *et al.*, 1998) (Figura 8, em A). Nós obtivemos um peso molecular aparente de 36 KDa para a proteína HIS-LACK, de 30 KDa para a proteína HIS-LSTI1. Com relação à banda secundária na proteína recombinante HIS-LeIF, nós creditamos este fato devido a degradação da mesma durante o processo de expressão da proteína *in vitro*. E ainda, nós observamos uma pequena alteração no padrão de migração da proteína HIS-TSA (30 KDa) quando comparado aquela descrita na literatura (24 KDa), e a este fato atribuímos a formação de dímeros via pontes de dissulfeto, o que já foi descrito ocorrer (Chae *et al.*, 1994).

Após a extração das proteínas recombinantes, as mesmas foram purificadas em coluna de afinidade por níquel ou em gel SDS-PAGE como descrito em Materiais e Métodos.

De acordo com o descrito na literatura, onde o epítopo para reconhecimento por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos, presente no antígeno LACK, é conhecido (Launois *et al.*, 1997), realizamos então experimentos de clonagem da sequência de DNA deste epítopo em fusão com a sequência da proteína GST. Amplificação da sequência de DNA foi feita, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), e na região 3' da sequência gênica da GST, foi clonado a sequência do epítopo para linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Análise de restrição enzimática confirmaram a respectiva clonagem, e a expressão da proteína foi induzida em bactérias. Após purificação e análise por eletroforese em gel SDS-PAGE, observamos um padrão de peso molecular de aproximadamente 33 KDa (Figura 8, em B), que quando comparado a proteína GST apenas, mostrou-se como uma banda de maior peso molecular. Para verificar se os genes por nós clonados codificavam proteínas com características similares àquelas expressas nos diferentes estágios do parasito, anticorpos policionais foram utilizados em experimentos de imunolocalização, contra cada proteína de interesse. Para tanto, camundongos BALB/c foram imunizados com as respectivas proteínas recombinantes em ACF, e numa segunda dose em AIF, cada qual contendo 10µg de cada proteína recombinante. Os camundongos controles foram imunizados com CFA apenas. O soro dos animais foi obtido como descrito em Material e Métodos.

Por imunofluorescência indireta e através de microscopia "ConFocal" foi possível observar que houve reconhecimento das respectivas proteínas em ambas as formas parasitárias (promastigotas e amastigotas) de *L. (V.) braziliensis*, utilizando-se o soro dos animais imunizados para cada antígeno.

Para as formas promastigotas, a imunofluorescência mostrou ter tido reconhecimento antiparasitário com padrão em comum a cada antígeno, a partir do soro dos animais imunizados, sendo de forma difusa ao longo do citoplasma parasitário, comparável à imunofluorescência obtida a partir do soro de animais infectados experimentalmente com *L. (V.) braziliensis* (Figura 9).

Ainda nas formas promastigotas, para o antígeno LACK, а imunofluorescência não apresentou nenhum reconhecimento que pudesse evidenciar uma região de compartimentalização para este antígeno, apesar de pontos mais fluorescentes poderem ser observados às vezes perto do núcleo parasitário, por vezes próximo à membrana. Já para o antígeno TSA, a imunofluorescência pareceu estar concentrada por vezes em áreas ao longo do citoplasma de algumas formas, e com padrão mais difuso quando comparado ao antígeno LACK. Para o antígeno LeIF, observamos uma imunofluorescência dispersa ao longo do citoplasma, de padrão difuso, não evidenciando áreas onde pudesse estar ocorrendo uma compartimentalização da proteína, sendo fraca no reconhecimento flagelar. A imunofluorescência para o antígeno LbSTI1 também mostrou ter sido fraca no reconhecimento flagelar, mas com reconhecimento puntual nas regiões anterior e posterior destas formas parasitárias.

O controle negativo foi feito utilizando soro de animais imunizados com CFA apenas, e o mesmo mostrou uma imunofluorescência muito fraca ao longo de todo o citoplasma. Já o controle positivo, sendo soro de animais infectados com *L*. (*V.*) *braziliensis*, mostrou uma imunofluorescência forte ao longo de todo o parasita. Para as formas amastigotas (Figura 10) obtidas a partir de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais, a imunofluorescência para o antígeno LACK mostrou ter sido às vezes de forma difusa e por vezes puntual ao longo do citoplasma e núcleo da célula hospedeira, assim como no citoplasma parasitário, apesar de apresentar por vezes estruturas lineares no citoplasma das formas amastigotas. Para o antígeno TSA, a imunofluorescência mostrou estar focada somente nas formas parasitárias, com padrão puntuado no citoplasma do mesmo, e com marcação na superfície de algumas formas amastigotas. Para os antígenos LeIF e LbSTI1, as imunofluorescências mostraram-se similares a do antígeno LACK, com marcação puntuada granular no citoplasma, às vezes localizada na superfície parasitária.

Em parte, o padrão de reconhecimento utilizando-se soro dos animais imunizados foi semelhante aquele utilizando o soro de pacientes infectados por *L*. *(V.) braziliensis*, como pode ser observado através da sobreposição das duas imagens obtidas para cada antígeno (Figura 10, imagens fundidas).

O controle negativo utilizado no experimento foi soro de animais imunizados com CFA apenas, mostrando não haver reconhecimento dos macrófagos infectados. Na mesma coluna, quanto ao soro de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, este foi utilizado como um controle positivo do reconhecimento antiparasitário. A reação para macrófagos não infectados foi negativa (dados não mostrados).

# 4.3. Resposta imune induzida pela imunização utilizando-se antígenos de *L*. *(V.) braziliensis.*

Com o objetivo de verificar se estes antígenos de *L. (V.) braziliensis* poderiam ser utilizados em estratégias de imunização, a fim de gerar uma resposta imune específica, os mesmos foram subclonados nos respectivos vetores de expressão, e seus produtos foram utilizados em experimentos de imunização na formulação de DNA e/ou proteína recombinantes.

Para tanto, a fase de leitura aberta dos respectivos genes de *L. (V.) braziliensis* foram subclonados no vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3 (Invitrogen). Na região 5' dos genes foi clonado também, em fusão, a sequência de DNA que codifica para um peptídeo sinal da cadeia k da imunoglobulina de camundongos. A exceção foi o antígeno LACK, que foi clonado com e sem este petídeo sinal (p-LACK e p-IgSP-LACK).

Os plasmídios recombinantes obtidos foram sequenciados para checagem da construção vetorial, o que foi confirmado (dados não mostrados).

Os esquemas de imunização na formulação de DNA e proteína recombinantes foram mantidos em todos os experimentos, sendo utilizadas doses de 100  $\mu$ g de DNA recombinante e 25  $\mu$ g de proteína recombinante, nos devidos casos. Foram 3 doses administradas, intramuscularmente (DNA recombinante) ou intraperitonealmente (proteína recombinante), com intervalos de 2 semanas entre cada dose. Ao final do esquema de imunização havia um período de 2 a 3 semanas para a realização do experimento seguinte, quer fosse para obtenção de órgãos linfóides para análises *in vitro*, quer fosse para o desafio parasitário. As imunizações com proteínas recombinantes continham também CpG ODN 1826 (10  $\mu$ g/mL) e hidróxido de alumínio 2% (Alum) (2,5  $\mu$ L/ $\mu$ g proteína recombinante). Os grupos controles foram imunizados com pcDNA3 e/ou os adjuvantes apenas, de acordo com a estratégia adotada.

Exceções de esquemas de imunização foram realizadas, e serão ressaltadas quando ocorrerem no decorrer da apresentação dos resultados.

### 4.3.1. A resposta imune humoral induzida.

Vamos nos focar inicialmente nos experimentos realizados com o antígeno LACK apenas, onde após camundongos da linhagem BALB/c serem imunizados com os plasmídios p-LACK, pIgSP-LACK e pcDNA3, avaliamos a produção específica de anticorpos do istotipo IgG, em ensaios de "immunoblotting", onde observamos que o grupo do soro dos animais imunizados com ambas as formulações plasmidiais (com e sem peptídeo sinal fusionado) contendo o gene *lack*, possuíam anticorpos que reconheciam a proteína recombinante HIS-LACK imobilizada em membranas de nitrocelulose, sendo que o mesmo não ocorreu com o soro do grupo controle (Figura 11, em A).

Em experimentos contendo todos os antígenos, também foi observado que quando os animais foram imunizados respectivamente com os plasmídios pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF, pIgSP-LbSTI1, houve reconhecimento específico das respectivas proteínas recombinantes pelo soro de cada animal imunizado (Figura 11, em B). É de se notar que o reconhecimento pelo grupo imunizado com os plasmídios contendo os antígenos LeIF e LbSTI1, apresentou uma maior intensidade de fluorescência. Já para os antígenos LACK e TSA os reconhecimentos pelos soros dos camundongos individuais não seguiram o mesmo padrão na sua maioria, mas os que o fizeram, mostrou ser de forma específica para o antígeno.
Em outro experimento, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com os plasmídios na formulação de DNA recombinante, em separado ou em conjunto quanto aos plasmídios utilizados, ressaltando neste último caso foram imunizados todos que animais com os antígenos (LACK+TSA+LeIF+LbSTI1), na devida formulação. Em experimentos de ELISA, utilizando as respectivas proteínas recombinantes imobilizadas em placa de 96 poços (5 µg/mL), observamos que houve a detecção de anticorpos do isotipo IgG, somente no soro dos animais imunizados com o antígeno LbSTI1 e com todos os antígenos (Figura 12, em A). Foram considerados positivos os títulos de anticorpos com valores logarítmicos maiores que 2.

A fim de compararmos a relação entre as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) que predominanvam no soro destes animais com altos títulos de anticorpos, realizamos experimentos de ELISA, e observamos a presença específica de anticorpos IgG2a em maior proporção que IgG1, em ambos os grupos (imunizados com o antígeno LbSTI1 e todos os antígenos, na formulação de DNA recombinante) (Figura 12, em B).

Quando os animais foram imunizados com as respectivas proteínas recombinantes, em conjunto novamente ou em separado, observamos que todos os grupos de animais apresentaram soros com títulos de anticorpos IgG, em valores logarítmicos maiores que 2 (Figura 13, em A). Quando analisamos a proporção entre as subclasses de IgG1 e IgG2a, observamos que no soro dos animais imunizados com o antígeno TSA apenas, havia uma maior proporção de anticorpos de subclasse IgG2a, enquanto todos os outros grupos de animais imunizados (LACK, LeIF, LbSTI1 e todos os antígenos) mostraram haver uma proporção de anticorpos de subclasse IgG1 maior que IgG2a (Figura 13, em B).

Interessantemente, quando os soros dos animais imunizados com todos os antígenos combinados, na formulação de DNA recombinante, foram reagidos *in vitro*, com as respectivas proteínas recombinantes isoladamente, nós observamos que dos anticorpos específicos produzidos, estes eram em resposta ao antígeno LbSTI1 (dados não mostrados). E ainda, quando a mesma análise foi feita com o soro dos animais imunizados com todos os antígenos, na formulação de proteína recombinante, não observamos esta resposta (dados não mostrados).

### 4.3.2. A resposta imune celular induzida.

Sabendo que animais imunizados com os antígenos, em ambas formulações vacinais (DNA e proteína recombinantes), geraram anticorpos específicos, analisamos se esta imunização levaria também à produção de IFN-γ por células de baço.

Nos experimentos realizados com o antígeno LACK apenas, grupos de animais foram imunizados com os plasmídios p-LACK, pIgSP-LACK e pcDNA3, e restimulados *in vitro* com a proteína recombinante HIS-LACK. Detectamos no sobrenadante das culturas uma maior quantidade de IFN- $\gamma$  produzida por animais imunizados com os plasmídios p-LACK e pIgSP-LACK, e que esta foi dose dependente quanto ao restímulo (1 e 10 µg/mL) (Figura 14, em A).

Como já descrito na caracterização do gene *lack*, sobre a presença de uma região imunodominante reconhecida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (EpLT), testamos *in vitro* a capacidade da proteína recombinante GST-EpLT, em restimular esplenócitos de animais imunizados para produção de citocinas, de modo antígeno-específico. Observamos que a produção de IFN- $\gamma$  foi igual comparando os diferentes restímulos protêicos, HIS-LACK e GST-EpLT, em ambos os grupos de animais imunizados com o antígeno LACK (p-LACK e pIgSP-LACK) (Figura 14, em B).

Para checarmos o quanto da produção de IFN- $\gamma$  estava sendo mediada pelas subpopulações linfocitárias TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, anticorpos monoclonais anti-CD4 (hibridoma GK1.5) e/ou anti-CD8 (2.43) foram adicionados às culturas concomitante ao restímulo *in vitro* com o antígeno. Nossos resultados mostraram que esplenócitos de animais imunizados com ambos os plasmídios p-LACK e pIgSP-LACK, produziram uma menor quantidade de IFN- $\gamma$  na presença de anti-CD4 quando comparado ao controle (IgG de rato) (Figura 15, em A). Com relação à inibição com anti-CD8, observamos que a diminuição não foi tão pronunciada quanto com anti-CD4, mas a mesma ocorreu. E na inibição com ambos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, a produção da citocina foi bastante diminuída. Quando o reestímulo das células foi feito utilizando-se a proteína recombinante GST-EpLT, houve uma grande inibição da resposta imune na presença de anti-CD4, mas não de anti-CD8 (Figura 15, em B). Em experimentos de imunização com os plasmídios pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF, pIgSP-LbSTI1, em conjunto ou em separado, além do grupo pcDNA3, observamos que esplenócitos de animais do grupo controle negativo (pcDNA3) produziram pequenas quantidades de IFN- $\gamma$ , ao restímulo com as diferentes proteínas recombinantes (Figura 16, em A), e ainda, esplenócitos de animais imunizados com os antígenos de interesse foram capazes de produzirem IFN- $\gamma$  em maior quantidade, frente ao restímulo específico com as respectivas proteínas recombinantes (Figura 16, em B). Resultados similares para a produção de IFN- $\gamma$  foram obtidos quando animais foram imunizados com os plasmídios apenas em separado, num outro experimento (dados não mostrados), sendo observado uma maior produção de IFN- $\gamma$  pelo grupo de animais imunizados com o antígeno TSA, nesta formulação, em comparação à produção representada na figura.

Resultados também similares foram obtidos quando animais foram imunizados na formulação de proteína recombinante. Assim, camundongos BALB/c foram imunizados com os antígenos LACK, TSA, LeIF e LbSTI1, em conjunto ou em separado, em adição a CpG ODN e Alum, e seus esplenócitos foram restimulados *in vitro* com as respectivas proteínas recombinantes. Observamos nestes experimentos uma pequena produção de IFN-γ pelos esplenócitos dos animais imunizados com CpG ODN e Alum apenas (Figura 17, em A), em comparação aqueles imunizados com os antígenos específicos, sendo a exceção os animais imunizados com o antígeno LbSTI1, onde não foi detectado quantidades consideráveis da citocina (Figura 17, em B).

# 4.4. Padronização de um modelo de infecção para *L. (V.) braziliensis* em camundongos isogênicos.

A fim de podermos testar a capacidade protetora dos nossos candidatos a antígenos vacinais, contra a infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*, padronizamos em nosso laboratório um modelo de infecção experimental para esta espécie, desenvolvido em colaboração com a Dra. Yasmine Belkaid (Laboratório de Doenças Parasitárias, NIAID, "National Institutes of Health" (NIH), Bethesda, Estados Unidos da América, endereço atual), no "Cincinnati Children's Hospital Medical Center", em Ohio (EUA), na Divisão de Imunologia Molecular, Departamento de Imunobiologia.

Para tanto obtivemos formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, cepa Torrez, cedida gentilmente pelo Dr. David L. Sacks (NIAID, NIH). Segundo informações obtidas, estes parasitas foram isolados de um paciente na Guatemala em 1983, com a forma mucocutânea de leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* (tipada por anticorpos monoclonais).

O DNA genômico deste parasita foi obtido e feito a tipagem quanto à espécie de *Leishmania* que a representava. A tipagem foi feita gentilmente pela Dra. Lucile M. Floeter-Winter (Departamento de Biofísica, USP-SP, endereço atual), baseado em padrões moleculares de amplificação por PCR (Castilho *et al.*, 2003), e foi observado ser pertencente ao complexo *Viannia* e a espécie *braziliensis* (dados não mostrados).

Os parasitas foram mantidos em cultura axênica, até a fase estacionária, quando então foram purificados em gradiente de Ficoll, de acordo com o descrito na literatura (Spath & Beverley, 2001). A metodologia consiste basicamente em submeter os parasitas a um gradiente de centrifugação, onde numa determinada faixa de concentração de Ficoll, entre 10 a 15%, com isto há o enriquecimento de formas parasitárias, onde há a retenção de formas parasitárias mais leves, consideradas como formas metacíclicas infectivas.

Estas formas promastigotas metacíclicas obtidas foram utilizadas em experimentos de infecção intradérmica, na orelha de camundongos da linhagem BALB/c, machos, numa dose de  $1 \times 10^6$  parasitas/orelha.

Ao longo dos primeiros experimentos de infecção não foi observado desenvolvimento de lesão. No entanto, sempre foi notado que havia sinal de inflamação nas orelhas infectadas. As orelhas dos camundongos infectados eram retiradas e então processadas para cultivo *in vitro*, para o crescimento de formas promastigotas do parasita no frasco de cultura. Após o primeiro repique, enriquecimento de formas metacíclicas eram novamente obtidas e estes parasitas eram inoculados em camundongos, seguindo a mesma metodologia.

Num dos experimentos de infecção, após a quinta semana foi observado que uma orelha, das quatro infectadas, apresentou lesão, através da formação de um nódulo. Assim, as orelhas deste animal foram retiradas na oitava semana de infecção, e os parasitas cultivados *in vitro*. As formas promastigotas em fase estacionária foram purificadas, e novamente orelhas de camundongos foram infectadas.

Neste experimento, na terceira semana pós-infecção, foi observado o surgimento de uma primeira lesão, em uma orelha das quatro infectadas, sendo que a última orelha a apresentar um nódulo foi após a quinta semana de infecção. A formação de lesão ulcerada foi observada no primeiro camundongo a apresentar o nódulo (Figura 18). Nestes animais, foi verificada a presença de parasitas, nos orgãos linfóides de drenagem (linfonodos retro-maxilares), quando estes foram removidos, macerados e feito cultivo *in vitro* para o crescimento de formas promastigotas (dados não mostrados).

Em experimentos de citometria de fluxo, quando foram utilizados anticorpos marcados para as moléculas CD4 e CD25, foi observado que o número de células T CD4<sup>+</sup> presentes no sítio de infecção era equivalente ao número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, em ambos animais analisados (Figura 19).

Durante os vários experimentos de infecção, alguns camundongos foram mantidos por um longo período, e então pudemos observar que os sinais de inflamação se perpetuaram durante um longo tempo, e que, após 22 semanas de infecção, interessantemente, ainda havia parasitas viáveis, observados através do cultivo *in vitro*, a partir das orelhas infectadas, apesar destas não apresentarem nenhum sinal de lesão ou formação de nódulo ao longo de todo o período de infecção avaliado (dados não mostrados).

Nos experimentos de infecção, observamos que os camundongos, após um período compreendendo entre a quinta e sétima semana, dependendo do experimento, apresentaram o pico de infecção, observado pelo tamanho do nódulo formado na orelha destes camundongos. Nos experimentos avaliados, todos os camundongos tenderam a resolução espontânea da lesão (dados não mostrados).

# 4.5. Avaliação de resposta imune protetora induzida pela imunização com antígenos de *L. (V.) braziliensis*.

A fim de checarmos se a resposta imune gerada pela imunização genética contendo antígenos de *L. (V.) braziliensis* seria capaz de proteger contra infecção homóloga, realizamos experimentos de imunização dos animais seguido de desafio.

Assim hamsters Golden machos foram imunizados com os antígenos na formulação de DNA recombinante, com os plasmídios combinados quanto aos seus antígenos carreados, sendo os grupos: pIgSP-LACK + pIgSP-LeIF, pIgSP-TSA + pIgSP-LbSTI1 e pcDNA3. Duas semanas após a terceira dose intramuscular, os animais foram infectados subcutaneamente na base da pata traseira. Nossos resultados mostram que não houve diferença entre os grupos quando o tamanho do nódulo formado foi analisado (Figura 19, em A), mesmo quando num outro experimento, onde os plasmídios foram administrados todos em conjunto e foram comparados ao grupo controle pcDNA3 (Figura 19, em B). Num outro experimento, feito em colaboração com o Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (UFOP), camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados, na mesma formulação vacinal, com os plasmídios pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF, pIgSP-LbSTI1, em conjunto ou em separado, além de pcDNA3 e salina, e infectados com  $1\times10^5$  formas promastigotas metacíclicas de *L. (V.)* braziliensis, subcutaneamente na base da pata traseira. Observamos quanto à formação de nódulo que não houve diferença entre os grupos imunizados (Figura 20). Quando foi dosado a citocina IL-4 no sobrenadante de cultura de células esplênicas restimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), não observamos diferença entre os grupos, sendo que todos os valores detectados estavam abaixo de 20 pg/mL (dados não mostrados). Quando foi medida a quantidade da citocina IFN- $\gamma$  presente no sobrenadante de cultura de células de linfonodo drenante restimuladas com SLA, não observamos diferença estatística significante entre os diferentes grupos imunizados (dados não mostrados).

Em outro experimento, camundongos machos da linhagem BALB/c foram imunizados intradermicamente numa orelha, com 50 µg dos plasmídios pIgSP-LACK ou pcDNA3, e após a terceira dose foram infectados na outra orelha com  $1x10^6$  formas promastigotas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez). O que observamos foi que os animais imunizados com o antígeno LACK apresentaram lesões de tamanhos igualmente comparáveis aos animais imunizados com pcDNA3, senão podendo dizer que houve uma tendência a serem maiores que no grupo controle pcDNA3 (Figura 21, em A). Quando medimos o número de parasitas presentes na derme das orelhas na décima semana pós-infecção, observamos que os animais imunizados com o antígeno LACK apresentaram um maior número de parasitas quando comparado ao grupo controle, tanto no sítio de infecção (orelha) quanto no linfonodo de drenagem (retromaxilar) (Figura 21, em B e C).

Num outro experimento de desafio, animais BALB/c machos foram imunizados com os antígenos em conjunto ou em separado, como descrito anteriormente, sendo duas doses na formulação de DNA recombinante, e seguidos de uma ou duas doses de proteína recombinante em adição a CpG e Alum, no sistema de imunização conhecido por "prime-boost". De 2 a 3 semanas após a última imunização, os animais foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de cultura *in vitro* de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (cepa BA788, gentilmente cedidos pela Dra. Camila I. Oliveira, FIOCRUZ BA). Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatística quanto a medida da lesão formada na orelha dos camundongos, tanto quando foram imunizados com 2 doses de DNA e 1 de proteína recombinante, assim como quando foi administrado duas doses de DNA e duas doses de proteína recombinante (Figura 22 A e B, respectivamente).

# 4.6. Modulação da resposta imune usando anticorpos que reagem com células reguladoras.

Considerando o papel de células reguladoras durante a resposta imune efetora e subsequente imunidade gerada, à infecção por *L. (L.) major* (Belkaid *et al.*, 2002), utilizamos anticorpos monoclonais capazes de reconhecer estas células reguladoras a fim de modular a resposta imune efetora específica durante a infecção experimental por *Leishmania*. Assim, tratamos camundongos com anticorpos monoclonais durante a infecção com *L. (L.) major*. Para tanto, usamos o anticorpo monoclonal anti-GITR (hibridoma DTA-1).

Inicialmente, devido à disponibilidade de animais nocautes que não expressam a molécula GITR, pudemos realizar experimentos para avaliar a importância desta molécula durante a infecção experimental por *Leishmania*. Para tanto, as orelhas dos animais nocautes e selvagens foram infectadas com formas promastigotas metacíclicas purificadas de cultura de fase estacionária de *L. (L.) major*. Nossos resultados mostraram que os animais nocautes para a molécula GITR foram mais resistentes à infecção, quando comparados ao grupo de animais selvagens (Figura 23), quando analisado a formação de nódulo nas orelhas infectadas.

#### Resultados

Quando analisamos, por citometria de fluxo, as subpopulações linfocitárias presentes no sítio de infecção, e a quantidade das mesmas, verificamos que células efetoras (T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) estavam presentes em quantidades maiores no grupo de animais nocautes, quando comparado ao grupo controle, na quinta semana pósinfecção, a qual conotava com a fase aguda da infecção experimental. Com relação às células reguladoras (T  $CD4^+CD25^+$ ), não havia diferença estatística quando comparados os dois grupos (Figura 24, em A). Quando analisamos através de marcação intracitoplasmática, o número de células T  $CD4^+$  produtoras de IFN- $\gamma$ presente no sítio de infecção, observamos que os animais nocautes para GITR apresentavam um maior número destas células, quando comparado aos animais selvagens (Figura 24, em B). Por último, quando analisamos por ELISA a produção da citocina IFN-y, por células do linfonodo de drenagem da infecção, linfonodos retromaxilares, verificamos que na oitava semana de infecção houve a detecção maior na quantidade desta citocina no sobrenadante das células cultivadas *in vitro* do grupo de animais nocautes, quando comparado ao grupo de animais selvagens, sendo o mesmo não observado na quinta semana de infecção (Figura 24, em C).

Realizamos também experimentos de citometria de fluxo que foram analisados através da utilização dos marcadores TCR $\beta$ , CD4, CD25 e GITR, quando camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 foram infectados com *L*. *(L.) major*. Pudemos observar que tanto na fase aguda (4 semanas), como na fase crônica ( $\geq$  12 semanas) de infecção, e tanto no sítio de infecção (orelha), quanto no linfonodo de drenagem (retromaxilar), tanto as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) como as TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (T<sub>efet</sub>) expressavam o marcador GITR na superfície celular (Figura 25). Observamos que as células T reguladoras apresentaram uma maior expressão da molécula GITR, em comparação às células T efetoras. Em seguida, anticorpos monoclonais anti-GITR e IgG isotipo controle foram utilizados, numa dose de 1,0 mg intraperitonealmente, semanalmente, durante o período de 4 semanas, após infecção com formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (L.) major*, e o que pudemos observar em experimentos de ELISA para detecção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, foi que no sobrenadante de cultura *in vitro* de células de linfonodo de drenagem dos diferentes grupos de animais tratados, no grupo de animais que receberam anti-GITR foi detectado uma maior quantidade da citocina IFN- $\gamma$ , quando comparado ao tratamento com anticorpo isotipo (Figura 26, em A), ao contrário do observado para a citocina IL-10, a qual foi detectada uma menor quantidade no grupo de animais tratados com anti-GITR, em comparação ao grupo controle onde foi detectado uma maior produção da citocina IL-10 (Figura 26, em B). Em outro experimento, animais foram tratados com os mesmos anticorpos monoclonais, com 0,5 mg, 2 vezes por semana, i.p., durante todo o período de infecção avaliado (6 semanas). Assim camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (L.) major*, e tratados como descrito com os anticorpos anti-GITR e IgG isotipo controle. Quando avaliamos o desenvolvimento de nódulo na orelha destes animais, observamos que aqueles tratados com o anticorpo anti-GITR repetidas vezes, apresentou menor lesão comparando-o ao grupo controle, tratado com IgG isotipo controle (Figura 27).

Quando quantificamos a carga parasitária no sítio de infecção e no linfonodo de drenagem, observamos que houve uma tendência nos animais tratados com anticorpos anti-GITR repetidas vezes, a possuirem um menor número de parasitas, em ambos os sítios, quando comparado ao grupo controle de animais, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente diferente (Figura 28, em A e B).

Quando medimos por ELISA a quantidade da citocina IFN-γ produzida por células do linfonodo de drenagem, observamos que no grupo de animais tratados com anti-GITR repetidas vezes, havia uma maior quantidade da citocina detectada no sobrenadante de cultura, quando comparado ao grupo de animais tratados com o anticorpo isotipo controle (Figura 29).

```
Lm GenBank ->
MNYEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVV TSRDGTAISWKANPDRHSVDSDYGLPSHRLEG
63

L. (V.) b. ->
MNYEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVV TSRDGTAISWKANPDRHSVDSDYGLPSHRLEG
63

Lm GenBank ->
HTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRMWDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAG
126

L. (V.) b. ->
HTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRMWDLRNGQSQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDRLIVSAG
126

Lm GenBank ->
RDNVIRVWNVAGECMHEFLRDHEDWVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWNVNGGKCERT
189

L. (V.) b. ->
RDNVIRVWNVAGECMHEFLRDHEDWVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWNVNGKCERT
189

Lm GenBank ->
RDNVIRVWNVAGECMHEFLRDHEDWVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWNVNGKCERT
189

Lm GenBank ->
LKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLSTGEQLFRINVESFINQIAFSPNRFWMCV
252

Lm GenBank ->
LKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLSTGEQLFRINVESFINQIAFSPNRFWMCV
252

Lm GenBank ->
AFERSLSVYDLESKAVIAELTPDGEKPSECISIAWSADGNTLYSGHKDNLIRVWSISDAE
312
```

Figura 3 – Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências preditas de aminoácidos do gene *lack* clonado a partir de DNA genômico de *L*. *(V.) braziliensis*.

As seqüências de aminoácidos do gene *lack* das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* são mostradas, sendo esta última obtida através de acesso ao Banco de Genes; em cinza, substituição de resíduos de aminoácidos conservada; em preto, substituição de resíduos de aminoácidos não conservada; destaque colorido, epítopo reconhecido por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos.


## Figura 4 – Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências preditas de aminoácidos do gene *tsa* clonado a partir de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*.

As seqüências de aminoácidos do gene *tsa* das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* são mostradas, sendo esta última obtida através de acesso ao Banco de Genes; em cinza, substituição de resíduos de aminoácidos conservada; em preto, substituição de resíduos de aminoácidos não conservada; destaque colorido, resíduos de cisteína na sequência do gene.



## Figura 5 – Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências preditas de aminoácidos do gene *lbsti1* clonado a partir de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*.

As seqüências de aminoácidos do gene *lbsti1* das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* são mostradas, sendo esta última obtida através de acesso ao Banco de Genes; em cinza, substituição de resíduos de aminoácidos conservada; em preto, substituição de resíduos de aminoácidos não conservada.

Lm	GenBank	->	MACTORIAPQDQDSFLDDQPGVRPIPSFDDMPLHQNLLRGIYSYGFEKPSSIQQRAIAPFTRGGDIIAQAQSGTGKTGAFS	81
L.	(V.) b.	->	MSQCDRVAPQDQDSFLDDQPGVRPIPSFDDMPLHQNLLRGIYSYGFEKPSSIQQRAIAPFTRGGDIIAQAQSGTGKTGAFS	81
Lm	GenBank	->	IGLLQRLDFRHNLIQGLVLSPTRELALQTAEVISRIGEFLSNSSKFCETFVGGTRVQDDLRKLQAGVIVAVGTPGRVSDVI	162
L.	(V.) b.	->	IGLLQRLDFRHNLIQGLVLSPTRELALQTAEVISRIGEFLSNSAKFCETFVGGTRVQDDLRKLQAGVVVAVGTPGRVSDVI	162
Lm	GenBank	->	KRGALRTESLRVLVLDEADEMLSQGFADQIYEIFRFLPKDIQVALFSATMPEEVLELTKKFMRDPVRILVKRESLTLEGIK	243
L.	(V.) b.	->	KRGALRTESLRVLVLDEADEMLSQGFADQIYEIFRFLPKDIQVALFSATMPEEVLELTKKFMRDPVRILVKRESLTLEGIK	243
Lm	GenBank	->	QFFIAVEEEHKLDTLMDLYETVSIAQSVIFANTRRKVDWIAEKLNQSNHTVSSMHAEMPKSDRERVMNTFRSGSSRVLVTT	324
L.	(V.) b.	->	QFFIAVEEEHKLDTLMDLYETVSIAQSVIFANTRRKVDWIAEKLNQSNHTVSSMHAEMPKSDRERVMNTFRSGSSRVLVTT	324
Lm	GenBank	->	DLVARGIDVHHVNIVINFDLPTNKENYLHRIGRGGRYGRKGVAINFVTEKDVELLHEIE <mark>A</mark> HYHTQIDELPVDFAAYLGE-	403
L.	(V.) b.	->	DLVARGIDVHHVNIVINFDLPTNKENYLHRIGRGGRYGRKGVAINFVTEKDVELLHEIE <mark>G</mark> HYHTQIDELPVDFAAYLGE-	403

Figura 6 - Alinhamento múltiplo pelo método Clustal W, das sequências preditas de aminoácidos do gene leif clonado a partir de DNA genômico de L. (V.) braziliensis.

As sequências de aminoácidos do gene leif das espécies L. (V.) braziliensis e L. (L.) major são mostradas, sendo esta última obtida através de acesso ao Banco de Genes; em cinza, substituição de resíduos de aminoácidos conservada; em preto, substituição de resíduos de aminoácidos não conservada.



## Figura 7 – Análise por "Northern-Blot" da transcrição de mRNA dos genes por nós clonados de *L. (V.) braziliensis*, em ambas as formas parasitárias.

Em A, hibridação com o gene *lack* utilizado como sonda radioativa; em B, hribridização com o gene tsa; em C, com o gene *leif*; em D, com o gene lbsti1; e em E, com o gene  $\alpha$ -*tubulina*. As sondas radioativas foram obtidas a partir do produto de amplificação por PCR de cada gene. Foram utilizados 10 µg de mRNA total de cada forma parasitária para cada amostra representada.



Figura 8 – Eletroforese em gel SDS-PAGE das proteínas recombinantes expressas e purificadas, referentes aos genes por nós clonados de *L. (V.) braziliensis*.

Em A, proteínas recombinantes referente aos antígenos LACK, TSA, LeIF e LbSTI1 de *L*. (*V.*) *braziliensis*; e em B, proteína recombinante representando o epítopo para reconhecimento por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos (EpLT), ou apenas GST. Foi utilizado cerca de 600 ng de proteína por lacuna do gel.



**Figura 9 – Ensaio de imunofluorescência indireta de formas promastigotas de** *L. (V.) braziliensis.* Reação com soro policional de animais imunizados com as respectivas proteínas recombinantes, somente com CFA (controle negativo) ou com soro de animais infectados com formas promastigotas (controle positivo). Quadros A e B, soro anti-LACK; Quadros C e D, soro anti-TSA; Quadros E e F, soro anti-LeIF; Quadros G e H, soro anti-LbSTI1; Quadros I e J, soro controle negativo; e Quadros K e L, soro controle positivo; Linha superior, contraste diferencial de Nomarski; e linha inferior, imunofluorescência indireta.



**Figura 10 – Reação de imunofluorescência indireta com macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c, infectados com** *L. (V.) braziliensis.* Imagens adquiridas através de microscopia Confocal. Reação com soro policlonal de animais imunizados com as respectivas proteínas recombinantes, somente com CFA (controle negativo), ou com soro policlonal de pacientes portadores de leishmaniose mucocutânea (controle positivo). Linha 1, contraste diferencial de Nomarski; linha 2, soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes; linha 3, soro humano controle conjugado com FITC; linha 4: sobreposição das imagens das linhas 2 e 3. Quadros de A a D: soro anti-LACK; Quadros de E a H, soro anti-TSA; Quadros de I a L, soro anti-LeIF; Quadros de M a P, soro anti-LbSTI1; Quadro R, soro de animais imunizados com CFA; Quadro S, soro de paciente portador de leishmaniose mucocutânea (controle positivo); Quadro T, imagens fundidas dos quadros R e S; e quadros U a X, soro de paciente portado de leishmaniose mucocutânea (controle positivo).



Figura 11 – "Western Blotting" de reconhecimento das proteínas recombinantes (His-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1) por soro de animais imunizados com os respectivos plasmídios. Em A, soro individual de 2 camundongos imunizados respectivos plasmídios representados figura, revelação com os na e por quimioluminescência. Em B, canaletas de 1 a 7: soro individual dos animais imunizados com os respectivos plasmídios contendo os genes de interesse; canaletas de 8 a 10: soro individual de 3 animais controle imunizados com pcDNA3, sendo a revelação por DAB. Foi utilizado cerca de 600 ng de cada proteína recombinante imobilizada nas membranas.



Figura 12 – ELISA para detecção de anticorpos IgG, e suas subclasses, a partir do soro de animais imunizados com os respectivos plasmídios na formulação de DNA recombinante. Foi utilizado o conjunto de soro policional obtido dos animais imunizados. Em A, títulos de anticorpos totais anti-IgG. Em B, razão das subclasses de IgG detectadas nos soros dos animais. Foi imobilizado na placa 5 μg/mL de cada proteína recombinante purificada.



**Figura 13 – ELISA para detecção de anticorpos IgG, e suas subclasses, a partir do soro de animais imunizados com os respectivos antígenos na formulação de proteína recombinante.** Foi utilizado o conjunto de soro policional obtido dos animais imunizados. Em A, títulos de anticorpos totais anti-IgG. Em B, razão das subclasses de IgG detectadas nos soros dos animais. Foi imobilizado na placa 5 μg/mL de cada proteína recombinante purificada.



**Figura 14 – ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de células de baço de camundongos imunizados.** Imunização com os plasmídios pcDNA3 (controle), p-LACK ou pIgSP-LACK, clonados de *L. (V.) braziliensis*. Estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes: em A, His-LACK (0,1 a 10 µg/mL), e em B, GST-EpLT (25 µg/mL), GST (25 µg/mL), e His-LACK (10 µg/mL),.



Figura 15 – ELISA para detecção dos níveis de IFN-γ produzidos em cultura de células de baço de camundongos imunizados, concomitante à inibição por anticorpos monoclonais. Imunização com os plasmídios pcDNA3 (controle), p-LACK ou pIgSP-LACK, clonados de *L. (V.) braziliensis*. A estas culturas foi adicionado Ig de Rato (10 µg/mL), anti-CD4 (10 µg/mL), anti-CD8 (10 µg/mL), ou anti-CD4 (10 µg/mL) e anti-CD8 (10 µg/mL). Restímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes: em A, His-LACK (10 µg/mL), e em B, GST-EpLT (25 µg/mL). Análise estatítica pelo teste *t* de student, onde \* e \*\*, p < 0,05.



Figura 16 – ELISA para detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos em cultura de células de baço de camundongos imunizados com os antígenos em conjunto ou em separado, na formulação de DNA recombinante. Imunização com os plasmídios pcDNA3 (controle), pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF e pIgSP-LbSTI1, clonados de *L. (V.) braziliensis*. Estímulo *in vitro* com os respectivos antígenos recombinantes HIS-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1. Em A, grupo imunizado com pcDNA3 apenas; e em B, grupos de animais imunizados com os antígenos de interesse em conjunto ou em separado. Análise estatítica pelo teste *t* de student, onde \*, p < 0,05.



Figura 17 – ELISA para detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos em cultura de células de baço de camundongos imunizados com os antígenos em conjunto ou em separado, na formulação de proteína recombinante. Imunização com as proteínas recombinantes HIS-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1 (25 µg de cada proteína), sendo adicionado CpG ODN (10 µg por animal) e ALUM (2,5 µL/µg proteína) à formulação vacinal. Estímulo *in vitro* com os respectivos antígenos recombinantes (10 µg de cada proteína). Em A, grupo imunizado com CpG ODN e ALUM apenas; e em B, grupos de animais imunizados com os antígenos de interesse em conjunto ou em separado, na devida formulação vacinal. Análise estatítica pelo teste *t* de student, onde \*, p < 0,05.



Figura 18 – Fotografia de lesão de orelha de camundongos BALB/c machos após 7 semanas de infecção com formas promastigotas metacíclicas enriquecidas de *L. (V.) braziliensis.* Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas gerados em gradiente de Ficoll. A infecção foi feita em ambas as orelhas, intradermicamente, num volume de 10  $\mu$ L. (n=2).



**Figura 19 – Citometria de fluxo de tecido dérmico infectado por** *L. (V.) braziliensis.* Camundongos BALB/c foram infectados como descrito na figura 18. Foi analisado o número total de células por com marcação para moléculas de superfície CD4 e CD25, após 7 semanas de infecção. Os camundongos foram analisados separadamente. Não foi observado diferença estatística entre as diferentes subpopulações linfocítárias analisadas em cada camundongo.



Figura 20 – Curso de infecção de hamsters Golden machos imunizados com os respectivos plasmídios representados na figura, seguidos de infecção por *L. (V.) braziliensis.* Os animais foram imunizados com os respectivos antígenos em combinação, como representado na figura, em 3 doses intramusculares. Os animais foram desafiados 15 dias após a última imunização com 1x10<sup>5</sup> formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Em A, imunização com os antígenos pIgSP-LACK e pIgSP-LeIF em conjunto, e pIgSP-TSA e pIgSP-LbSTI1 em conjunto, além de pcDNA3 (controle); em B, imunização com os antígenos pIgSP-LACK, pIgSP-LeIF e pIgSP-LbSTI1 em conjunto, além de pcDNA3 (controle). (n=6). Foi utilizado no desafio a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis*, provindo da Dra. Miriam L. Dorta (UFGO).



Figura 21 – Curso de infecção de camundongos C57BL/6 fêmeas imunizados com os respectivos plasmídios representados na figura, seguidos de infecção por *L. (V.) braziliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de cada plasmídio, em conjunto ou em separado como representado na figura, e infectados com  $1x10^5$  formas promastigotas metacíclicas purificadas, s.c., na pata traseira. (n=5). Foi utilizado no desafio a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis*, provindo do laboratório do Dr. Luis Carlos C. Afonso (UFOP).



Figura 22 – Curso de infecção de camundongos BALB/c imunizados com os respectivos plasmídios, seguidos de infecção por *L. (V.) braziliensis*, e quantificação parasitária nos sítios de infecção e drenante. Os animais foram imunizados com 50µg de DNA recombiannte em cada orelha, em 2 doses, i.d., e infectados com  $1x10^6$  formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (V.) braziliensis*. Em A, curso da infecção; em B, quantificação parasitária pelo método de diluição limitante. (n=4). Não foi observado diferença estatística nos parâmetros analisados, pelo teste *t* de student. Foi utilizado na infecção a cepa Torrez de *L. (V.) braziliensis*.



Figura 23 – Curso de infecção de camundongos BALB/c imunizados com os respectivos antígenos na formulação de DNA e proteína recombinantes, seguido de infecção por *L. (V.) braziliensis.* Em A, imunização com 2 doses dos respectivos plasmídios (100  $\mu$ g por animal) e 1 dose das respectivas proteínas recombinantes (25  $\mu$ g de cada proteína, além de CpG ODN e ALUM); em B, 2 doses de DNA recombinante seguido de 2 doses de proteína recombinante, como descrito em A. Os animais foram infectados com 1x10<sup>5</sup> formas promastigotas de fase estacionária de cultura axênica, em ambas as orelhas, intradermicamente, num volume de 10  $\mu$ L. (n=3). Foi utilizado no desafio a cepa BA788 de *L. (V.) braziliensis*.



Figura 24 – Curso de infecção de camundongos nocautes e selvagens para a molécula GITR, infectados por *L. (L.)* major. Os animais foram infectados com  $3x10^3$  formas promastigotas metacíclicas purificadas do parasita, intradermicamente, em ambas as orelhas. A carga genética dos animais nocautes é de camundongos da linhagem C57BL/6. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes. Análise estatística pelo test *t* de Student. (n=4).



Figura 25 – Citometria de fluxo e ELISA para IFN-γ, dos camundongos nocautes e selvagens para GITR infectados com *L. (L.) major*. Os animais foram infectados como descrito na figura 24. Em A, número total de células por citometria de fluxo com marcação para moléculas de superfície CD4 e CD25, em B, número de células produtoras de IFN-γ por citometria de fluxo com marcação intracelular. Para ambas as citometrias, foi feito o "gate" em TCR-β antes das respectivas marcações. Em C, ELISA para quantificação de IFN-γ no sobrenadante de cultura de células do linfonodo de drenagem restimuladas com SLA, nas semanas 5 e 8 pós-infecção. Análise estatística pelo test *t* de Student.



**Figura 26** – **Citometria de fluxo para expressão da molécula GITR em camundongos C57BL/6 infectados com** *L. (L.) major.* Os animais foram infectados como descrito na figura 23, e analisados 4 ou 12 semanas após a infecção. Células dérmicas da orelha e células de linfonodo de drenagem foram analisadas para expressão de GITR, por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, painel superior, e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, painel inferior. Foi utilizado anticorpo anti-GITR biotinilado. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes. (n=4).



Figura 27 – ELISA para produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células de órgãos linfóides de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major* e tratados com anticorpo anti-GITR. Os animais foram infectados como descrito na figura 24. Após a infecção os camundongos foram tratados com 1,0 mg de anticorpo anti-GITR ou anticorpo isotipo controle, semanalmente durante as 4 semanas avaliadas. Em A, detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células de linfonodo de drenagem restimuladas com SLA; em B, detecção dos níveis de IL-10, nas mesmas condições descritas em A. (n=4). Análise estatística pelo test *t* de Student.



Figura 28 – Curso de infecção de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major*, e tratados com anticorpo anti-GITR ou IgG isotipo. Os animais foram infectados como descrito na figura 24. Após a infecção os camundongos foram tratados com 0,5 mg de anticorpo anti-GITR ou anticorpo isotipo controle, duas vezes por semana durante as 6 semanas avaliadas. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes. \* p<0,05, teste *t* de Student. (n=4).



Figura 29 – Quantificação parasitária em diferentes sítios de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major* e tratados com anticorpo anti-GITR ou isotipo controle. Os animais foram infectados e tratados com os anticorpos como descrito na figura 28. A quantificação foi feita por diluição seriada limitante. Em A, quantificação em células da derme da orelha; em B, quantificação em linfonodo de drenagem (retromaxilar). O resultado não mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados, pelo test *t* de Student. (n=4). Não foi observado diferença estatística entre os diferentes grupos de animais, nos parâmetros analisado, e pelo teste *t* de Student.



Figura 30 – ELISA para detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) major* e tratados com anticorpo anti-GITR ou IgG isotipo. Os animais foram infectados e tratados como descrito na figura 28. As células do linofnodo de drenagem foram restimuladas com SLA. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes. (n=4). Análise estatítica pelo test *t* de Student.

5. Discussão

O objetivo do trabalho foi explorar se antígenos de *Leishmania (V.)* braziliensis seriam capazes de induzir resposta imune protetora em estratégias de imunização, contra a infecção experimental por *L. (V.)* braziliensis. Um ponto de partida para seleção destes antígenos, diante dos vários existentes, foi utilizar aqueles previamente descritos sendo utilizados em estratégias vacinais contra leishmaniose cutânea, causada por *L. (L.) major*, e que mostraram serem protetores. Assim clonamos os antígenos LACK, TSA, LeIF e LbSTI1, da espécie *L. (V.)* braziliensis, e os utilizamos em diferentes estratégias de imunização seguidas de infecção experimental.

Iniciamos o trabalho analisando a sequência predita de aminoácidos dos genes por nós clonados, que revelou haver na sua maioria alta identidade quanto a sequência predita de aminoácidos, comparando as sequências das diferentes espécies, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*.

Nosso estudo mostrou na análise comparativa que os antígenos LACK, LeIF e LbSTI1 são altamente conservados entre as diferentes espécies de *Leishmania* analisadas. As identidades foram de 92% a 98% (Figuras 3, 5 e 6), quando comparadas as sequências preditas de aminoácidos das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*. Na sequência do antígeno LACK (Figura 3) foi observado que a região de reconhecimento por linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos, já descrita na literatura, é altamente conservada entre diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo aquelas do gene por nós clonado (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*) (dados não mostrados).

Na análise comparativa do antígeno TSA, observamos que o mesmo apresentou identidade menor que os outros antígenos (83%), quando comparadas às seqüências preditas de aminoácidos das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* (Figura 4).

Foi observado nos estudos realizados que ocorreram algumas substituições de resíduos de aminoácidos ao longo das sequências de todos os antígenos

analisados comparativamente nas diferentes espécies de *Leishmania*, sendo que algumas destas substituições não alteram as propriedades dos aminoácidos, quanto à carga dos mesmos. O antígeno TSA de *L. (V.) braziliensis* que mostrou ser o mais distinto dos antígenos quando comparado à *L. (L.) major*, mostrou possuir várias substituições de aminoácidos, o que pode acarretar na geração de uma resposta imune diferenciada daquela já descrita na literatura, quando utilizado o antígeno em estratégias de imunização.

O antígeno LeIF (Figura 5) mostrou ser o mais idêntico, quando analisadas as sequência de aminoácidos, igualmente ao antígeno LACK. Por último, o antígeno LbSTI1 também mostrou ser conservado entre as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*, apesar da região altamente polimórfica detectada durante a comparação (Figura 6). A mesma discrepância nesta sequência é observada quando seqüências de diferentes organismos são comparadas, como no caso de humanos, leveduras, soja e outras espécies de *Leishmania* (dados não mostrados).

Em seguida, decidimos melhor caracterizar estes antígenos quanto à transcrição dos mesmos nas formas parasitárias promastigotas e amastigotas. Observamos em experimentos de "Northern Blot" que todos os antígenos por nós estudados estavam sendo expressos em ambas as formas parasitárias, o qual já havia sido analisado quanto à espécie *L. (L.) major*, cujo mRNA nos serviu de controle (Figura 7).

Em seguida foi feita análise de imunolocalização de expressão protéica *in vivo* destes antígenos em parasitas da espécie *L. (V.) braziliensis*. Assim, primeiramente obtivemos as proteínas recombinantes HIS-LACK, HIS-TSA, HIS-LeIF e HIS-LbSTI1 (Figura 8), e em ensaios de imunização de camundongos com as respectivas proteínas, obtivemos o soro policional de camundongos e os utilizamos nestes experimentos de imunolocalização.

Formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram analisadas por imunofluorescência indireta ou por microscopia "ConFocal". Em nossos

estudos verificamos que todos os antígenos são expressos em ambas as formas parasitárias.

Observamos que todos os antígenos foram reconhecidos pelo soro dos animais, e que estes antígenos apresentaram-se difusamente distribuídos, principalmente nas formas promastigotas parasitárias (Figura 9). Já nas formas amastigotas observamos um padrão amplamente distribuído com relação aos antígenos LACK, LeIF e LbSTI1, ainda mais quando as imagens obtidas foram sobrepostas àquelas obtidas no reconhecimento por soro de humanos, mostrando assim pontos comuns de reconhecimento pelos soros de camundongos e humanos (Figura 10).

Sabendo então que estes antígenos clonados de *L. (V.) braziliensis* são expressos nas formas promastigotas e amastigotas, assim como possuem consideráveis níveis de identidade com os mesmos antígenos de *L. (L.) major*, com os quais estratégias de imunização foram realizadas com sucesso, partimos então para experimentos de imunização de animais de laboratório, tanto nas formulações de DNA como proteína recombinantes.

Utilizando vetores de expressão em células eucarióticas contendo os genes de interesse, respostas imunes específicas contra as respectivas proteínas recombinantes foram geradas após a inoculação intramuscular dos plasmídios. Nós observamos que a maioria dos camundongos imunizados com os plasmídios contendo os genes foi capaz de desenvolver anticorpos específicos detectados por "immunoblot" (Figura 11, em A), onde percebemos que a intensidade do reconhecimento dos anticorpos dos animais imunizados com os diferentes plasmídios foi extremamente variável. Em várias ocasiões, observamos que os soros dos animais imunizados com os plasmídios pIgSP-LeIF e pIgSP-LbSTI1 reconheceram muito bem as suas respectivas proteínas recombinantes, em contraste aos soros dos animais imunizados com os plasmídios pIgSP-LACK e pIgSP-TSA, que reconheceram pobremente as respectivas proteínas recombinantes (Figura 11, em B).

123

Como determinado por ELISA, a magnitude da resposta de anticorpos foi maior nos animais imunizados com o plasmídio pIgSP-LbSTI1 e com todos os plasmídios em conjunto, na formulação de DNA recombinante. Os anticorpos gerados pela imunização com os outros plasmídos, pIgSP-LACK e pIgSP-TSA, foram indetectáveis em nossos ensaios, e ainda os níveis de anticorpos daqueles imunizados com pIgSP-LeIF apesar de serem detectáveis, não se mostraram com altos títulos (dados não mostrados). A subclasse predominante de IgG no soro dos animais que apresentaram altos títulos de anticorpos, pIgSP-LbSTI1 e todos os plasmídios em conjunto, foi IgG2a (Figura 12, em B), sugerindo um predomínio de resposta do tipo  $T_{\rm H}1$ .

Interessantemente, no grupo de animais imunizados com todos os plasmídios em conjunto, quando foi realizado o experimento de ELISA, os soros obtidos dos animais foram reagidos contra cada proteína recombinante em separado, como também em conjunto. Observamos nestes soros que apenas contra a proteína recombinante LbSTI1 estava sendo gerada a resposta imune humoral, e que quando reagidos os soros contra todas as proteínas em conjunto, títulos muito similares foram detectados (dados não mostrados).

Quando animais foram imunizados com as proteínas recombinantes, detectamos por ELISA que anticorpos específicos foram gerados em todos os grupos de animais, incluindo aqueles imunizados com todas as proteínas em conjunto. Magnitudes muito similares quanto aos títulos de anticorpos gerados foram observadas, mas com diferentes razões nas subclasses de IgG. Observamos que apenas o grupo de animais imunizados com o antígeno TSA apresentou um predomínio de resposta humoral típica T<sub>H</sub>1, com uma razão IgG1/IgG2a com valor abaixo de 1,0 (Figura 13, em B). Ao contrário da imunização com DNA recombinante, quando os soros dos animais imunizados com todas as proteínas em conjunto foram reagidos contra as proteínas recombinantes em separado e em conjunto, observamos não haver diferença quanto aos títulos de anticorpos produzidos, mostrando assim uma resposta de igual magnitude contra cada proteína neste grupo de animais (dados não mostrados).

Assim concluímos que a produção de anticorpos nos grupos de camundongos imunizados tanto na formulação de DNA quanto proteína recombinantes foi específica, mas apresentando diferenças em termos de magnitude, especificidade e subclasses de IgG.

Dados de outros laboratórios mostram haver diferenças na magnitude de resposta gerada utilizando os mesmos antígenos, porém clonados de *L. (L.) major*, assim como diferenças nas respostas de subclasses de IgG. Isto conota a diversidade de resposta que pode ser obtida quando o mesmo antígeno é utilizado em estratégias de imunização, considerando a espécie do qual é obtido este antígeno.

A resposta imune mediada por células foi estimada *in vitro* através da detecção da produção específica de IFN- $\gamma$ . Quando restimuladas *in vitro* com as respectivas proteínas recombinantes, células de baço de camundongos imunizados com os devidos antígenos, em conjunto ou em separado, secretaram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ .

O nosso trabalho explorou melhor a resposta ao antígeno LACK, já que este veio sendo estudado há mais tempo. Inicialmente clonamos este antígeno de *L.* (*V.*) braziliensis, imunizamos camundongos BALB/c intramuscularmente com os plasmídios pc-LACK e pIgSP-LACK, além de pcDNA3 (controle negativo) diferindo um do outro quanto a presença da sequência do peptídeo sinal da cadeia *kappa* de imunoglobulina de camundongo, e analisamos a resposta imune gerada. Assim, por ELISA, verificamos que a produção de IFN- $\gamma$  foi dose-dependente quanto ao restímulo *in vitro*, e observamos também que as células esplênicas dos animais imunizados com o plasmídio contendo o peptídeo sinal (pIgSP-LACK) produziram uma maior quantidade da citocina (Figura 14, em A).

Testamos também a produção de IFN- $\gamma$  frente ao restímulo *in vitro* com a proteína recombinante contendo apenas o epítopo de reconhecimento por linfócitos murinos T CD4<sup>+</sup>. Observamos que a mesma magnitude de resposta é gerada tanto no restímulo com o epítopo (GST-EpLT) quanto com a proteína recombinante (HIS-LACK), corroborando dados da literatura de que este seja um epítopo para reconhecimento por linfócitos murinos (Figura 14, em B).

Ao determinarmos os subtipos celulares responsáveis pela produção *in vitro* da citocina IFN- $\gamma$ , observamos que células linfocitárias T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> durante o processo de imunização foram geradas, e que estas respondem de forma similar ao restímulo com ambas as proteínas recombinantes (HIS-LACK e GST-EpLT), corroborando os experimentos para produção da citocina (Figura 15, em A e B). Evidentemente, a diminuição na produção de IFN- $\gamma$  foi acentuada quando anticorpos anti-CD4 foram utilizados nestes experimentos, mostrando assim o importante papel deste subtipo para produção da devida citocina. Interessante notar que quando o anticorpo anti-CD8 foi utilizado no restímulo com a proteína recombinante GST-EpLT, não foi detectada diferença na produção de IFN- $\gamma$  quando comparado ao restímulo com IgG de rato, mostrando assim que este epítopo é único e exclusivo para células T CD4<sup>+</sup>.

Partimos então para experimentos de imunização com os antígenos de interesse. Inicialmente avaliamos a produção da citocina IFN- $\gamma$  no grupo de animais imunizados com os antígenos na formulação de DNA recombinante.

Detectamos no sobrenadante de cultura *in vitro* dos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com os antígenos, que houve a produção antígeno-específica da citocina em questão. Observamos que o grupo de animais imunizados com o plasmídio pIgSP-TSA, durante o restímulo com a respectiva proteína recombinante, quando comparado ao restímulo inespecífico (meio apenas), não produziu níveis estatisticamente significantes e diferentes de IFN- $\gamma$ , neste ensaio (Figura 16, em B). Mas resultados anteriores mostram ter sido

126

estatisticamente diferente a produção da citocina com relação a este antígeno (dados não mostrados).

Resultados similares quanto a especificidade de produção da citocina foi observado quando os camundongos foram imunizados com as respectivas proteínas recombinantes, excluindo a imunização com o antígeno LbSTI1, na qual não observamos níveis significantes de IFN-γ produzidos, quando o restímulo específico foi feito (Figura 17, em B). O ensaio de ELISA foi repetido para este antígeno, e novamente obtivemos o mesmo resultado.

Sendo assim, observamos de uma forma geral que células produtoras de IFN-γ foram induzidas pela imunização contendo estes antígenos, tanto nas formulações de DNA como proteína recombinantes, com exceção da imunização com HIS-LbSTI1.

O fato de a imunização de camundongos BALB/c contendo os genes por nós clonados de *L. (V.) braziliensis* ter levado a ativação de respostas imunes específicas, permitiu-nos determinar se estas imunizações com DNA e proteína recombinantes poderiam gerar uma imunidade protetora contra a infecção experimental por parasitas do gênero *Leishmania*.

Para tanto, obtivemos inicialmente um modelo de infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*, o que feito em colaboração com a Dra. Yasmine Belkaid. Através de consecutivas infecções intradérmicas, após enriquecimento das formas promastigotas metacíclicas, observamos a formação de lesão em camundongos BALB/c, no sítio de infecção (orelhas) (Figura 18). Ficou evidente pelos nossos resultados que a capacidade de infecção dos parasitas utilizados foi aumentada, já que sempre foi utilizado a mesma metodologia e a mesma cepa de *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez), e que nos primeiros experimentos de infecção apenas sinais de inflamação eram observados. Há de se esclarecer se alguns clones infectivos de *L. (V.) braziliensis* foram selecionados através de consecutivas passagens *in vivo* dos parasitas, ou se o número de formas promastigotas metacíclicas obtidas para cada infecção foi aumentando, ao passo que estas eram enriquecidos.

Durante o processo de geração de lesão nas orelhas dos camundongos infectados, foi observado a formação de nódulos intradérmicos, com consistência endurecida, que com o tempo gerou uma lesão ulcerada central, de aspecto raso e bordas elevadas (Figura 18). Estes resultados corroboram dados de outro laboratório mostrando a formação de lesão ulcerada em orelhas de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (cepa BA788) (Moura *et al.*, 2005). Observamos em nossos experimentos que ocorreu migração de parasitas do sítio de infecção para os linfonodos de drenagem, obtidos por excisão do órgão, seguido de maceração e cultivo apropriado para o surgimento de formas promastigotas. O pico da infecção avaliado pela mensuração do nódulo formado, com a presença ou não de lesão ulcerada, girou em torno da quinta a oitava semana pós-infecção, com nódulos medindo de 1,5 a 4,5 mm no maior diâmetro (dados não mostrados).

Em experimentos de imunização contendo os antígenos na formulação de DNA, pIgSP-LACK, pIgSP-TSA, pIgSP-LeIF e pIgSP-LbSTI1, além de pcDNA3 como controle, realizamos infecções experimentais com formas promastigotas de cultura de *L. (V.) braziliensis* (cepa M2903), tanto em hamsters Golden como em camundongos C57BL/6, e observamos ao desafio parasitário que não houve diferença estatística quanto ao tamanho do nódulo formado no sítio de infecção em nenhum dos grupos de animais imunizados, contendo ou não os antígenos. Em alguns destes experimentos a associação de todos os antígenos em um dos grupos experimentais foi feita, não sendo observado também níveis consideráveis de proteção ao desafio parasitário (Figuras de 19 e 20).

O antígeno LACK foi testado separadamente, em estratégia de imunização contendo o plasmídio pIgSP-LACK, além de pcDNA3 como controle. Infecção intradérmica nas orelhas dos camundongos BALB/c foi feita com formas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. (V.) braziliensis* (cepa Torrez), não
sendo observado diferença entre os grupos de animais imunizados, inclusive notamos uma tendência a exarcebação do nódulo formado no grupo de animais imunizados com o antígeno LACK (Figura 21, em A). Quando medimos a carga parasitária, observamos uma tendência no grupo dos animais imunizados com o antígeno LACK a possuírem uma maior quantidade de parasitas, tanto na derme como nos linfonodos de drenagem, apesar da diferença não ter sido estatisticamente relevante (Figura 21, em B e C).

Em outro experimento, camundongos BALB/c foram imunizados com duas doses dos antígenos na formulação de DNA recombinante, seguidos de uma ou duas doses dos antígenos na formulação de proteína recombinante, em adição a CpG ODN e Alum, e quando estes animais foram desafiados, novamente não observamos proteção nas estratégias vacinais utilizadas (Figura 22, em A e B).

Estes resultados contradizem àqueles obtidos no desafio experimental com *L. (L.) major*, mas corroboram outros trabalhos onde os autores também não observaram níveis relevantes de proteção no desafio com outras espécies, utilizando-se dos mesmos antígenos por nós clonados.

Vacinações com o antígeno LACK levaram a imunidade protetora em outros modelos experimentais como infecções com *L. (L.) amazonensis* (Pinto *et al.*, 2004), ou *L. (L.) infantum* (Dondji *et al.*, 2005). Entretanto, em outros modelos experimentais não pôde ser observado imunidade protetora. A imunização de camundongos BALB/c com o antígeno LACK na presença de rIL-12 não foi capaz de conferir proteção contra a infecção com *L. (L.) amazonensis* (Coelho *et al.*, 2003). Utilizando o gene do antígeno LACK clonado de *L. (L.) donovani*, não houve um efeito protetor em resposta a imunização com DNA plasmidial, na presença ou ausência de DNA plasmidial da citocina IL-12 (Melby *et al.*, 2001). Assim como no caso de *L. (L.) mexicana* e desafiados com estes parasitas não apresentaram imunidade protetora significativa. Este resultado contrastou com o de animais imunizados com outros genes (*gp63*, *cpb* e *gp46*) que apresentaram proteção parcial no desafio com *L*. (*L*.) mexicana (Dumonteil et al., 2002).

Com relação aos outros antígenos poucos estudos foram desenvolvidos até o momento mostrando a capacidade protetora destes em esquemas de imunizações com desafio parasitário contra outras espécies de *Leishmania*. No entanto, mesmo na infecção experimental com *L. (L.) major*, observa-se proteção parcial no uso destes antígenos em diferentes estratégias de imunização (revisado por Kubar e Fragaki, 2005).

Alguns autores têm mostrado que o antígeno LeIF na formulação de DNA não foi capaz de induzir proteção quando formas amastigotas do parasita foram utilizadas no desafio (Ahmed *et al.*, 2004). Ainda mais, neste mesmo trabalho foi observado apenas proteção parcial com a imunização com o antígeno LACK. Ainda sobre o antígeno LeIF, sabe-se que PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea são capazes de responder ao antígeno recombinante gerando uma resposta tipicamente  $T_H1$ , e ainda tem sido mostrado ser um importante imunomodulador e como um potencial adjuvante em estratégias de imunização devido a sua capacidade indutora de IL-12 (Skeiky *et al.*,1998). Assim pode-se esperar deste antígeno que a sua associação a outros possa ser benéfica, mas no entanto isoladamente, nós não observamos níveis consideráveis de proteção em animais imunizados na formulação de DNA e proteína recombinante.

Com relação ao antígeno LmSTI1, Campos-Neto e cols, em 2002, mostraram que este antígeno gerou apenas uma resposta parcialmente protetora em ensaios de imunização seguido de desafio experimental com formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) major*, e somente um nível mais elevado de proteção foi obtido na associação ao antígeno TSA, ambos na formulação de DNA plasmidial. No entanto, quando rIL-12 foi utilizado em ensaios de imunização foi obervado níveis consideráveis de proteção ao desafio parasitário (Campos-Neto *et al.*, 2001). Ainda mais, este antígeno isoladamente foi capaz de gerar uma resposta mista  $T_H 1/T_H 2$  em linfonodos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* (Webb *et al.*, 1996).

Em estudos de associação de antígenos sem o uso de adjuvantes, Mendez e cols, em 2002, mostraram que o antígeno LACK gerou apenas proteção parcial no desafio com *L. (L.) major*, o mesmo sendo observado quando os antígenos TSA e LmSTI1 foram utilizados na imunização. Foi observada completa proteção à infecção somente no caso da associação dos três antígenos na formulação de DNA.

Os estudos feitos até agora indicam que um efeito protetor pode ser alcançado pela vacinação com estes antígenos em diversos modelos de infecção experimental, o que confirma o interesse destes para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Entretanto, a imunidade protetora não é reprodutível em vários outros modelos experimentais utilizados o que sinaliza a importância de se aprofundar os estudos nesta área.

Além dos antígenos, os adjuvantes a serem utilizados em estratégias de imunização são de relevante importância na indução de uma resposta imune desejada. Dentro disto vários componentes têm sido utilizados, e dentre eles sequências de DNA bacterianos conhecidos por motivos CpG ODN e compostos químicos como ALUM. Vários trabalhos mostram a capacidade adjuvante destes componentes em diversas estratégias de imunização, mostrando serem de suma importância na indução de resposta imune protetora (Rhee *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Kenney *et al.*, 1999; e Shah *et al.*, 2003).

Em nossos experimentos utilizamos estes adjuvantes concomitantes a estratégias de imunização com os respectivos antígenos na formulação de proteína recombinante, após imunização com DNA plasmidial, e os nossos resultados mostram que níveis de proteção relevante não foram obtidos.

No aspecto geral de estratégias de imunização, vários autores têm descrito os diversos problemas a serem resolvidos antes de uma vacina contra leishmaniose venha a ser tornar realidade. Quando organismos complexos como protozoários do gênero *Leishmania* interagem com o sistema imune, muitos de seus componentes são imunogênicos ao hospedeiro, como evidenciado pela indução de anticorpos e/ou imunidade celular. No entanto, alguns antígenos não apresentam nenhum valor em termos de proteção do hospedeiro ao desafio parasitário. Alguns antígenos até mesmo contribuem para a resposta patológica, por exemplo, através de reatividade cruzada com moléculas do hospedeiro (revisado por Handman, 2001).

Assim, não só estudos de antígenos imunogênicos e protetores assim como adjuvantes apropriados devem ser realizados nos diversos modelos de infecção experimental, com diferentes espécies de *Leishmania*, mas também é necessário se avaliar o modelo experimental a ser utilizado, e dentro disto tentar desvendar quais são os caminhos que levam a uma imunidade protetora neste modelo. Isto explicaria o por que de certos antígenos e estratégias de imunização serem eficazes num determinado modelo, mas não em outro; e isto é o que observamos dos resultados obtidos por nós.

Neste contexto e sob o ponto de visto evolucionário, estudos indicam uma origem neotrópica (novo mundo) para as espécies de *Leishmania*. Em análises filogenéticas baseadas em abordagens toxonômicas numéricas como a comparação de sequências de DNA e eletroforese de isoenzimas multilocus, mostram que a divergência entre os complexos de *Leishmania* ocorreu há cerca de 40-80 milhões de anos atrás. A distância filogenética entre *L. (L.) mexicana/L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, ambas causadoras de leishmaniose cutânea, é essencialmente idêntica à distância tanto de *L. (L.) mexicana/L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) major* em relação a *L. (L.) donovani*, que causa a forma visceral da doença. Assim, as espécies causadoras de leishmaniose cutânea (Novo Mundo-Velho Mundo) são tão diferentes uma da outra, como elas são daquelas que causam a forma visceral. Ainda mais, características epidemiológicas das diferentes espécies de *Leishmania* envolvem uma considerável faixa de hospedeiros reservatórios e insetos vetores. Os reservatórios mamíferos conhecidos giram em torno de várias ordens e são de

alguma maneira, seletivos para as espécies de Leishmania. Assim, não deve ser supreendente que fatores de virulência e imunogenéticos dos hospedeiros que controlam a resistência e suscetibilidade, variem enormemente entre as espécies de Leishmania transmitidas. A diferença entre as espécies fica mais evidente em comparação entre os complexos L. major, L. mexicana e L. donovani, onde vários genes operando no mesmo nível de ambas as respostas imunológicas, inata e adaptativa do hospedeiro, controlam a infecção experimental em hospedeiros murinos suscetíveis. Apesar de alguns destes genes, como exemplo os genes H-2 e H-11, estarem comumente envolvidos no controle da infecção pelas espécies destes três complexos já mencionados, nem todos os genes parecem contribuir igualmente no controle da infecção por todas as espécies de Leishmania. O antígeno NRAMP/Lsh (cromossomo 1), que controla a suscetibilidade/resistência inata durante infecção por espécies do complexo L. donovani, parece não influenciar no desenvolvimento da doença causada pelas espécies do complexo L. major, mas sim para infecção por espécies do complexo L. mexicana. Em conclusão, a suscetibilidade a doença causada por diferentes espécies de *Leishmania* parece ser regulada por múltiplos e distintos loci gênicos. Assim, não surpreende que também difiram na regulação imune da doença e/ou cura para cada espécie, os fatores de virulência (revisado por McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Fica evidente assim que diferentes espécies de *Leishmania* podem causar diferentes fenótipos patológicos em diferentes modelos de infecção, quanto à utilização de determinados antígenos. Foi o que observamos de nossos resultados onde os respectivos antígenos de *L. (V.) braziliensis* por nós clonados, não foram capazes de conferir proteção ao desafio homólogo seguido de diferentes estratégias vacinais, mesmo quando nós utilizamos potentes adjuvantes.

Assim fica difícil basear-se num modelo descrito na literatura, com seus respectivos resultados obtidos a partir da utilização de antígenos parasitários em

estratégias de imunização na infecção experimental por uma espécie de *Leishmania*, e querer extender estes resultados em um outro modelo.

Enfatizamos a necessidade de se esclarecer quais os mecanismos e o papel dos distintos componentes celulares que contribuem para a resolução ou disseminação de leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis*, em pacientes e em modelos animais. Dentro disto, vários autores têm proposto que uma exarcebada reação inflamatória guiada por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> desempenha um papel central na patologia. É controverso ainda o quanto células T CD8<sup>+</sup> são benéficas ou prejudiciais na resposta imune gerada na leishmaniose mucocutânea, além da participação de células T CD4<sup>+</sup> na indução e geração destas células T CD8<sup>+</sup>.

A fim de melhorarmos a resposta imune efetora gerada contra a infecção por *Leishmania*, resolvemos investigar o papel de células reguladoras neste processo. Assim, como já descrito na literatura, decidimos controlar o número de células reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), ou até mesmo a sua função, através de tratamentos com anticorpos monoclonais. Para tanto, utilizamos o anticorpo anti-GITR que parece modular a resposta imune durante a infecção.

Iniciamos através da investigação de camundongos nocautes para esta molécula (GITR), e observamos que estes animais foram mais resistentes à infecção por *L. (L.) major* (Figura 23), assim como observamos um aumento no número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> presentes no sítio de infecção, com um aumento no número de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , além de que no linfonodo de drenagem, após a oitava semana de infecção, havia um aumento na produção desta citocina pelas células linfocitárias drenantes (Figura 24, de A a C).

Verificamos que durante a infecção por *L. (L.) major* em animais selvagens, a expressão da molécula GITR estava aumentada nas células reguladoras, quando comparado a células efetoras. Este aumento da expressão se deu nas fases crônica e aguda da infecção, tanto no sítio de infecção como nos linfonodos drenantes, sendo as células reguladoras, o subtipo celular com aumento pronunciado na expressão da molécula. Apesar da diminuída expressão na superfície das células

efetoras, esta expressão foi evidente em todos os parâmetros analisados, sendo que no linfonodo de drenagem foi observado menor expressão da molécula pelas células efetoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) (Figura 25).

Sendo assim, especulamos que as células reguladoras poderiam ser o alvo principal da ação de anticorpos anti-GITR, os quais possuem função agonista, e com isto, tratamos camundongos C57BL/6 com 1,0 mg do anticorpo semanalmente, durante toda a infecção, e quando verificamos a produção das citocinas importantes que resultam em resistência e suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major*, sendo IFN- $\gamma$  e IL-10 respectivamente, observamos que células do linfonodo de drenagem estavam produzindo maior quantidade de IFN- $\gamma$  e menor quantidade de IL-10, nos animais tratados com anti-GITR, quando comparado aqueles tratados com o anticorpo isotipo controle (Figura 26).

Assim tratamos os animais novamente com o anticorpo anti-GITR ou isotipo controle, duas vezes por semana, durante todo o processo de infecção e verificamos que aqueles tratados com o anticorpo anti-GITR foram mais resistentes à infecção por *L. (L.) major* (Figura 27). Quando quantificamos a carga parasitária observamos haver uma tendência nos animais tratados com anti-GITR a terem uma menor quantidade de parasitas, tanto no sítio de infecção, quanto no linfonodo de drenagem (Figura 28, em A e B). Quando analisamos a produção de IFN- $\gamma$  pelas células do linfonodo de drenagem, observamos que o grupo dos animais tratados com anti-GITR estavam produzindo uma maior quantidade da citocina (Figura 29).

Concluímos destes resultados que o controle de células reguladoras por intermédio da utilização de anticorpos monoclonais anti-GITR, foi um veículo para obtermos uma melhor resposta imune efetora durante infecção experimental com *L. (L.) major*.

Seria de grande valia realizar estudos com o objetivo de checar os efeitos de anticorpos anti-GITR na infecção experimental com *L. (V.) braziliensis*, incluindo estudos em pacientes leishmanióticos, para se elucidar o possível efeito

135

terapêutico destes anticorpos em processos infecciosos e estratégias de imunização.

Em estudos realizados com pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis*, contendo a forma cutânea da doença, observou-se um grande número de células T reguladoras que expressam marcadores típicos deste subtipo celular como CD25, CTLA-4, FoxP3 e GITR, além de estarem produzindo grande quantidade de IL-10 e TGF- $\beta$ , nas lesões dérmicas. Interessantemente, estas células reguladoras derivadas do sítio da lesão suprimiram significante *in vitro* a resposta proliferativa de células T induzidas por fitohemaglutinina. Estes resultados sugerem que há um acúmulo de células T reguladoras funcionais no sítio de infecção por *Leishmania* em humanos, e que possivelmente contribuam para o controle local das funções de células T efetoras (Campanelli *et al.*, 2006).

Já no modelo murino suscetível à infecção experimental com *L. (L.) amazonensis*, sabe-se que células T CD4<sup>+</sup> de perfil T<sub>H</sub>1 medeiam a patogênese, sugerindo assim um mecanismo único de suscetibilidade à doença. No estudo de células reguladoras, observou-se que estas acumulam no sítio da lesão desde a fase inicial da infecção, e que produzem IL-10, e neste contexto suprimem a proliferação e produção de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) por células efetoras. Quando foi feita transferência adotiva de Treg para animais singenêicos, antes da infecção, observou-se uma redução significativa no desenvolvimento da doença; já a transferência de esplenócitos de camundongos "naive" depletados de Treg para camundongos deficientes em células T e B, observou-se um fenótipo mais sucetível em comparação aos animais que receberam esplenócitos controle (Ji *et al.*, 2005).

Pode-se atribuir assim um papel intrigante para as células reguladoras nas respostas imunológicas à infecção por *Leishmania* sp do Novo Mundo, enfatizando-se a existência de um balanço entre Treg e Tef na determinação da resolução da doença. Sendo assim, o uso de anticorpos específicos para as moléculas expressas por ambas populações linfocitárias (Treg e Tef), como o anti-

GITR, deve ser realizado com cautela, pois há a necessidade de se elucidar os mecanismos envolvidos nas interações celulares, por intermédio deste.

As vias de sinalização que ocorrem no engajamento de anticorpos anti-GITR ao seu receptor em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Tef) e em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg, incluindo aquelas Foxp3<sup>+</sup>) não é conhecido ainda, mas há um consenso que o efeito de anticorpos monoclonais anti-GITR tenha uma função agonista nestes tipos celulares, costimulando células efetoras, e suprimindo a função de células reguladoras (Shevack & Stephens, 2006). Já foi verificado *in vivo* o papel do engajamento de GITR ao seu ligante (GITR-L) em modelos murinos de infecção por HSV ("Herpes Simplex Virus"), sendo observado que o tratamento com anticorpos anti-GITR aumentou a resposta de células T específicas ao vírus, resultando em lesões inflamatórias severas (Suvas *et al.*, 2005).

Em tratamentos experimentais em camundongos contendo tumores, foi observado que a injeção intravenosa ou diretamente no sítio do tumor provocou uma potente imunidade específica com erradicação do tumor. Foi observado também que houve um grande infiltrado no tumor de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, incluindo aquelas secretoras de IFN- $\gamma$ , além de um aumento no número destas células nos baços dos animais (Ko *et al.*, 2006).

Em outro estudo sobre GITR foi observado que células NKT expressam constitutivamente esta molécula. Há também um aumento na expressão desta quando estimuladas via TCR. Experimentos através do uso de anticorpos anti-GITR foi capaz de costimular células NKT para secreção de grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , em comparação ao grupo controle. No modelo de hipersensibilidade à pneumonia, foi demonstrado *in vivo* que o engajamento de GITR ao seu receptor em células NKT aumentou a resposta imune inflamatória (Kim *et al.*, 2006).

Em estudos de imunização anti-tumoral, com DNA plasmidial efetivo contra o modelo murino experimental de melanoma B16, foi observado que o tratamento com anticorpos anti-GITR durante a segunda dose da vacina, aumentou a resposta de células T CD8<sup>+</sup> contra antígenos do melanoma, assim como aumentou a proteção ao desafio fatal com o tumor, prolongando a persistência de células T CD8<sup>+</sup> tumor-específicas, e o "recall" destas células após um reforço vacinal. Foi observado que o efeito da administração de anticorpos anti-GITR na resposta de células T CD8<sup>+</sup> induzidas pela vacina foi parcialmente independente de células T CD4<sup>+</sup>, mostrando assim um efeito costimulatório direto destes anticorpos sobre as células T CD8<sup>+</sup> (Cohen *et al.*, 2006).

Fica evidente desta forma que a inibição à supressão de células reguladoras através do uso de anticorpos monoclonais anti-GITR, favoreçe a resposta imune efetora dirigida por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , assim como outros tipos celulares como células NKT. Além disto, o seu uso como adjuvante vacinal parece ser adequado no intuito de se obter uma melhor resposta imune efetora destas células T, podendo atuar tanto no âmbito da resposta imune primária como de memória. Ainda, em processos infecciosos em que para sua resolução necessita-se de uma resposta imunológica inflamatória adequada e competente, o uso de anticorpos anti-GITR pode ser favorável.

6. Conclusões

Dos experimentos de vacinação contra a leishmaniose cutânea concluímos que: i) os quatro antígenos por nós clonados de *L. (V.) braziliensis* possuem potencial para utilização em estratégias de imunização contra infecção experimental por parasitas do gênero *Leishmania*; ii) as diferentes estratégias de imunização utilizadas não foram capazes de induzir significativa imunidade contra a infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*.

Dos experimentos sobre o papel do GITR na leishmaniose cutânea pudemos concluir que a molécula GITR tem um papel crítico durante a leishmaniose cutânea causada pela *L. (L.)* major, e que anticorpos anti-GITR tem um potencial para serem utilizados em estratégias de vacinação contra a leishmaniose cutânea potencializando a resposta imune específica.



- AHMED SBH, BAHLOUL C, ROBBANA C, ASKRI S & DELLAGI K. (2004) A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. Vaccine, 22: 1631-39.
- BELKAID Y. (2003) The role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Leishmania* infection. **Expert Opin. Biol. Ther.**, 3(6): 1-11.
- BELKAID Y, HOFFMAN KF, MENDES S, KAMHAWI S, UDEY MC, WYNN TA & SACKS DL. (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potencial of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J. Exp. Med., 194(10): 1497-506.
- BELKAID Y, MENDEZ S, LIRA R, KADAMBI N, MILON G & SACKS D. (2000) A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity J. Immunol., 165: 969-77.
- BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S, SHEVACH EM & SACKS DL. (2002) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, 420: 502-7.
- BELKAID Y, VALENZUELA JG, KAMHAWI S, ROWTON E, SACKS DL & RIBEIRO JM. (1998) Delayed-type hipersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptative response induced by the fly? **PNAS**, 97(12):6704-9
- BRODSKYN C, OLIVEIRA CI, BARRAL A & BARRAL-NETO M. (2003) Vaccines in leishmaniasis: advances in last five years. Expert Rev. Vaccines, 2(5): 705-17
- CAMPANELLI AP, ROSELINO AM, CAVASSANI KA, PEREIRA MS, MORTARA RA, BRODSKYN CI, GONÇALVES HS, BELKAID Y, BARRAL-NETTO M, BARRAL A & SILVA JS. (2006) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. J. Infect. Dis., 193(9): 1313-22.
- CAMPOS-NETO A, PORROZZI R, GREESON K, COLER RN, WEBB JR, SKEIKY YAW, REED SG & GRIMALDI JR G. (2001) Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Inf. Immun.**, 69(6): 4103-8.
- CAMPOS-NETO A, WEBB JR, GREESON K, COLER RN, SKEIKY YAW & REED SG. (2002) Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Inf. Immun.**, 70(6): 2828-36.
- CARVALHO EM, CORREIA FILHO D, BACELLAR O, ALMEIDA RP, LESSA H & ROCHA H. (1995) Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, 53(3): 273-7.
- CASTILHO TM, SHAW JJ & FLOETER-WINTER LM. (2003) New PCR assay using glucose 6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J. Clin. Microbiol., 41(2): 540-6.
- CHAE HZ, UHM TB & RHEE SG. (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **PNAS**, 91:7022-6.

- CHENG J, XIA XB & WANG G. (2001) Cloning and sequence analysis of activated protein kinase C recpetor gene of *Leishmania major*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 19(6): 373-4.
- COELHO EA, TAVARES CA & CARVALHO FA. (2003) Immune response induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, is protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Inf. Imm.**, 71: 3988-94.
- COHEN AD, DIAB A, PERALES MA, WOLCHOK JD, RIZZUTO G, MERGHOUB T, HUGGINS D, LIU C, TURK MJ, RESTIFO NP, SAKAGUCHI S & HOUGHTON AN. (2006) Agonist anti-GITR antibody enhances vaccineinduced CD8(<sup>+</sup>) T-cell responses and tumor immunity. **Cancer Res.**, 66(9): 4904-12.
- COLER RN & REED SG. (2005) Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends in Parasitol., 21(5): 244-9
- COLER RN, SKEIKY YAW, BERNARDS K, GREESON K, CARTER D, CORNELLISON CD, MODABBER F, CAMPOS-NETO A & REED SG. (2002) Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation and initiation factor protects against leishmaniasis. Inf. Immun., 70(8): 4215-25.
- DeKREY GK, LIMA HC & TITUS RG. (1998) Analysis of the immune response of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Inf. Imm.**, 66(2): 827-9.
- DONDJI B, PEREZ-JIMENEZ E, GOLDSMITH-PESTANA K, ESTEBAN M & McMAHON-PRATT D. (2005) Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. **Inf. Imm.**, 73(8): 5286-89.
- DUMONTEIL E, JESUS RSM, JAVIER EO & ROSARIO GMM. (2002) DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. Vaccine, 3644: 1-8.
- FARIA DR, GOLLOB KJ, BARBOSA JR J, SCHRIEFER A, MACHADO PRL, LESSA H, CARVALHO LP, ROMANO-SILVA MA, JESUS AR, CARVALHO EM & DUTRA WO. (2005) Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exarcebated inflamatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Inf. Immun., 73(12): 7853-9.
- FOLLADOR I, ARAUJO C, BACELLAR O, ARAUJO CB, CARVALHO LP, ALMEIDA RP & CARVALHO EM. (2002) Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin. Infect. Dis., 34(11): E54-8.
- FONG D, WALLACH M, KEITHLY J, MELERA PW & CHANG KP. (1984) Differential expression of mRNAs for alpha- and beta-tubulin during differenciation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. **PNAS**, 81(18): 5782-6.
- GONZALES-ASEGUINOLAZA G, TALADRIZ S, MARQUET A & LARRAGA V. (1999) Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA

replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **Eur. J. Biochem.**, 259: 909-16.

- GURUNATHAN S, SACKS DL, BROWN DR, REINER SL, CHAREST H, GLAICHENHAUS N & SEDER RA. (1997) Vaccination with DNA encoding immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. J. Exp. Med., 186(7): 1137-47.
- GURUNATHAN S, STOBIE L, PRUSSIN C, SACKS DL, GLAICHENHAUS N, FOWELL DJ, LOCKSLEY RM, CHANG JT, WU CY & SEDER RA. (2000) Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potencial immunoregulatory role for CD8<sup>+</sup> T cells. J. Immunol., 165: 915-24.
- HANDMAN E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin. Microbiol. Rev., 14(2): 229-43.
- ISHIOKA GY, FIKES J, HERMANSON G, LIVINGSTON B, CRIMI C, QIN M, DEL GUERCIO MF, OSEROFF C, DAHLBERG C, ALEXANDER J, CHESNUT RW & SETTE A. (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLArestricted CTL epitopes. J Immunol, 162:3915-25.
- JI HB, LIAO G, FAUBION WA, ABADIA-MOLINA AC, COZZO C, LAROUX FS, CATON A & TERHORST C. (2004) The natural ligand for glucocorticoidinduced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. J. Immunol., 172: 5823-7.
- 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. Immunol., 174: 7147-53.
- JOSHI M, DWYER DM & NAKHASI HL. (1995) Molecular cloning and characterization of a *Leishmania donovani* alpha-tubulin gene. J. Eukaryot. Microbiol., 42(5): 628-32.
- KANAMARU F, YOUNGNAK P, HASHIGUCHI M, NISHIOKA T, TAKAHASHI T, SAKAGUCHI S, ISHIKAWA I & AZUMA M. (2004) Costimulation via glucocorticoid-induced TNF recpetor in both conventional and CD25<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. J. Immunol., 172: 7306-14.
- KANE MM & MOSSER DM. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, 166: 1141-7.
- KENNEY RT, SACKS DL, SYPEK JP, VILELA L, GAM AA & EVANS-DAVIS K. (1999) Protective immunity using recombinant IL-12 and Alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J. Immunol., 163: 4481-88.
- KIM HJ, KIM HY, KIM BK, KIM S & CHUNG DH. (2006) Engagement of glucocorticoid-induced TNF receptor costimulates NKT cell activation *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol., 176(6): 3507-15.
- KO K, YAMAZAKI S, NAKAMURA K, NISHIOKA T, HIROTA K, YAMAGUCHI T, SHIMIZU J, NOMURA T, CHIBA T & SAKAGUCHI S. (2005) Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. J. Exp. Med., 202(7): 885-91.

- KUBAR J & FRAGAKI K. (2005) Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. Lancet Inf. Dis., 5: 107-14.
- LAEMMLI UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-5.
- LAINSON R. & SHAW JJ. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine, volume 1. Biology and Epidemiology. Academic Press Inc. (London). Editors: W. Peters and R. Killick-Kendrick.
- LAUNOIS P, MAILLARD I, PINGEL S, SWIHART KG, XENARIOS I, ACHA-ORBEA H, DIGGELMANN H, LOCKSLEY RM, MACDONALD HR & LOUIS JA. (1997) IL-4 rapidly produced by Vβ4 Vα8 CD4<sup>+</sup> T cells instructs Th2-development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Immunity**, 6:541-9.
- LEVICK MP, TETAUD E, FAIRLAMB AH & BLACKWELL JM. (1998) Identification and characterization of a functional peroxidosin from *Leishmania major*. J. Mol. Bioch. Parasitol., 96(1-2): 125-37.
- MACHADO P, ARAUJO C, DA SILVA AT, ALMEIDA RP, D'ÓLIVEIRA JR A, BITTENCOURT A & CARVALHO EM. (2002) Failure of early treatment cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. Clin. Infect. Dis., 34(12): E69-73.
- MAYRINK W, GENARO O, DIAS M, COSTA CA, MICHALICK MSM, MELO MN, WILLIAMS P, COSTA RT, NASCIMENTO E & LIMA AO. (1989) Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 31(6): 67-9.
- McMAHON-PRATT D & ALEXANDER J. (2004) Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, 201: 206-21.
- MELBY PC, NEVA FA & SACKS DL. (1989) Profile of human T cell response to leishmanial antigens. J. Clin. Inv., 83: 1868-75.
- MELBY PC, YANG J, ZHAO W, PEREZ LE & CHENG J. (2001) Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. Inf. Immun., 69(8): 4719-25.
- MENDEZ S, BELKAID Y, SEDER RA & SACKS D. (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. Vaccine, 20: 3702-8.
- MENDEZ S, GURUNATHAN S, KAMHAWI S, BELKAID Y, MOGA MA, SKEIKY YAW, CAMPOS-NETO A, REED S, SEDER RA & SACKS D. (2001) The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. J. Immunol., 166: 5122-8.
- MENDEZ S, TABBARA K, BELKAID Y, BERTHOLET S, VERTHELYI D, KLINMAN D, SEDER RA & SACKS DL. (2003) Coinjetction with CpGcontaining immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. **Inf. Imm.**, 71(9): 5121-29.

- MENDEZ S, RECKLING S, PICCIRILLO CA, SACKS D & BELKAID Y. (2004) Role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J. Exp. Med.**, 200(2): 201-10.
- MOUGNEAU E, ALTARE F, WAKIL AE, ZHENG S, COPPOLA T, WANG ZE, WALDMANN R, LOCKSLEY RM & GLAICHENHAUS N. (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science**, 268: 563-6.
- MOURA TR, NOVAIS FO, OLIVEIRA F, CLARENCIO J, NORONHA A, BARRAL A, BRODSKYN C & OLIVEIRA CI. (2005) Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Inf. Imm.**, 73(9): 5827-34.
- MYLER PJ, AUDLEMAN L, deVOS T, HIXSON G, KISER P, LEMLEY C, MAGNESS C, RICKEL E, SISK E, SUNKIN S, SWARTZELL S, WESTLAKE T, BASTIEN P, FU G, IVENS A & STUART K. (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unsual distribution of proteincoding genes. **PNAS**, 96(6): 2902-06
- NICHOLAS KB & NICHOLAS HBJ. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author, 1997.
- OLIVEIRA CI, TEIXEIRA MJ, TEIXEIRA CR, JESUS JR, ROSATO AB, SILVA JS, BRODSKYN C, BARRA-NETO M & BARRAL A. (2004) *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Micr. Inf.**, 6: 977-84.
- PINHEIRO PHC, DIAS SS, EULÁLIO KD, MENDONÇA IL, KATZ S & BARBIÉRI CL. (2005) Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi implicated in human and dog T-cell responses. Inf. Immun., 73(6): 3787-9.
- PINTO EF, PINHEIRO RO, RAYOL A, LARRAGA V & ROSSI-BERGMANN B. (2004) Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. Inf. Imm., 72(8): 4521-27.
- PROBST P, SKEIKY YAW, STEEVES M, GERVASSI A, GRABSTEIN KH & REED SG. (1997) A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **Eur. J. Immunol.**, 27: 2634-42.
- RHEE EG, MENDEZ S, SHAH JA, WU CY, KIRMAN JR, TURON TN, DAVEY DF, DAVIS H, KLINMAN DM, COLER RN, SACKS DL & SEDER RA. (2002) Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. J. Exp. Med., 195(12): 1565-73.
- SACKS D & ANDERSON C. (2004) Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. Immunol. Rev., 201: 225-38.
- SACKS D & NOBEN-TRAUTH N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Reviews, 2: 845-58.

- SCHILLING S & GLAICHENHAUS N. (2001) T cells that react to the immunodominant *Leishmania major* LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. **Inf. Immun.**, 69(2): 1212-4.
- 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. Immunological Reviews, 201: 318-38.
- SHAH JA, DARRAH PA, AMBROZAK DR, TURON TN, MENDEZ S, KIRMAN J, WU CY, GLAICHENHAUS N & SEDER RA. (2003) Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. J. Exp. Med., 198(2): 281-91.
- SHEVACH EM & STEPHENS GL. (2006) The GITR-GITR-L interaction: costimulation or contrasuppression of regulatory activity? **Nat. Rev. Immunol.**, 6: 613-8.
- SINAGRA A, RIARTE A, LUNA C, CAMPANINI A & SEGURA EL. (1997) Leishmania (Viannia) braziliensis: biological behavior in golden hamsters of isolates from argentine patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., 57(1): 115-8.
- SKEIKY YAW, COLER RN, BRANNON M, STROMBERG E, GREESON K, CRANE RT, CAMPOS-NETO A & REED SG. (2002) Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. Vaccine, 20: 3292-303.
- SKEIKY YAW, GUDERIAN JA, BENSON DR, BACELAR O, CARVALHO EM, KUBIN M, BADARO R, TRINCHIERI G & REDD SG. (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. J. Exp. Med., 181: 1527-37.
- SKEIKY YAW, KENNEDY M, KAUFMAN D, BORGES MM, GUDERIAN JA, SCHOLLER JK, OVENDALE PJ, PICHA KS, MORRISEY PJ, GRABSTEIN KH, CAMPOS-NETO A & REED SG. (1998) LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. J. Immunol., 161: 6171-9.
- SOUZA-NETO SM, CARNEIRO CM, VIEIRA LQ & AFONSO LCC. (2004) *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 99: 1-6.
- SPATH GF & BEVERLEY SM. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by densit centrifugation. Exp. Parasitol., 99: 97-103.
- SUVAS S, KIM B, SARANGI O, TONE M, WALDMANN H & ROUSER BT. (2005) In vivo kinetics of GITR and GITR ligand expression and their functional significance in regulating viral immunopathology. J. Virol., 79(18): 11935-11942.
- TEIXEIRA MJ, FERNANDES JD, TEIXEIRA CR, ANDRADE BB, POMPEU ML, SILVA JS, BRODSKYN CI, BARRAL-NETO M & BARRAL A. (2005) Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. Inf. Imm., 73(2): 1191-5.

- TOWBIN H, STAEHELIN T & GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76: 4350-4.
- TRAVI BL, OSORIO Y, MELBY PC, CHANDRASEKAR B, ARTEAGA L & SARAVIA NG. (2002) Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Inf. Immun.**, 70(5): 2288-96.
- WEBB JR, CAMPOS-NETO A, OVENDALE PJ, MARTIN TI, STROMBERG EJ, BADARO R & REED SG. (1998) Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Inf. Immun.**, 66(7): 3279-89.
- WEBB JR, CAMPOS-NETO A, SKEIKY YAW & REED SG. (1997) Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol., 89:179-93.
- WEBB JR, KAUFMANN D, CAMPOS-NETO A & REED SG. (1996) Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J. Immunol., 157: 5034-41.
- WHO, TDR Strategic Direction: Leishmaniasis. (2002), www.who.int/tdr



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2003) 75(4): 443-468 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) ISSN 0001-3765 www.scielo.br/aabc

# Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines

MAURICIO M. RODRIGUES<sup>1</sup>, SILVIA B. BOSCARDIN<sup>1</sup>, JOSÉ R. VASCONCELOS<sup>1</sup>, MEIRE I. HIYANE<sup>1</sup>, GERSON SALAY<sup>1</sup> and IRENE S. SOARES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina Universidade Federal de São Paulo, 04023-062 São Paulo, SP, Brasil
<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil

Manuscript received on July 30, 2003; accepted for publication on September 1, 2003; presented by GEORGE A. DOS REIS

## ABSTRACT

Obligatory intracellular parasites such as *Plasmodium* sp, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* sp are responsible for the infection of hundreds of millions of individuals every year. These parasites can deliver antigens to the host cell cytoplasm that are presented through MHC class I molecules to protective CD8 T cells. The *in vivo* priming conditions of specific CD8 T cells during natural infection are largely unknown and remain as an area that has been poorly explored. The antiparasitic mechanisms mediated by CD8 T cells include both interferon- $\gamma$ -dependent and -independent pathways. The fact that CD8 T cells are potent inhibitors of parasitic development prompted many investigators to explore whether induction of these T cells can be a feasible strategy for the development of effective subunit vaccines against these parasitic diseases. Studies performed on experimental models supported the hypothesis that CD8 T cells induced by recombinant viral vectors or DNA vaccines could serve as the basis for human vaccination. Regimens of immunization consisting of two different vectors (heterologous prime-boost) are much more efficient in terms of expansion of protective CD8 T lymphocytes than immunization with a single vector. The results obtained using experimental models have led to clinical vaccination trials that are currently underway.

Key words: CD8, parasites, immunity, vaccine.

## INTRODUCTION

The population at risk of infection by obligatory intracellular parasites is estimated at billions of individuals living mostly in tropical and subtropical regions of the world where these parasites are endemic.

*Plasmodium falciparum* is responsible for the larger burden of malaria, an estimated 300 million

Correspondence to: Maurício M. Rodrigues E-mail: mrodrigues@ecb.epm.br

cases of the disease per year that result in the death of more than 1 million people, mostly African children under the age of five. Altogether, the other most important intracellular parasites (*Plasmodium vivax*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* sp) are not responsible for as many infections or kill as many individuals as *P. falciparum*. Nevertheless, they are responsible for infecting millions of individuals yearly causing enormous social distress and economic losses. Although the pattern of disease transmission, infection and mortality caused by these obligatory intracellular parasites has changed in the past 50 years, worldwide they had never been a greater problem than they are today. In developing countries, these circumstances are very unlikely to improve in the next ten years. In view of these problems, the development of new strategies for prevention and control of these diseases are in great need.

Mass vaccination against these parasitic infections is not available. Research in this field can be considered important because in the future vaccines may complement other strategies such as chemotherapy, vector control etc., for the prevention and control of these parasitic diseases. Based on this conviction, studies on the mechanisms of host protective immunity and its target antigens have been pursued by immuno-parasitologists for the last 50 years.

#### HISTORICAL BACKGROUND

Pioneering studies performed in the sixties by Dr. Ruth S. Nussenzweig and collaborators at New York University firmly established that immunization with radiation-attenuated sporozoites could confer an exceptional degree of protection against experimental infection with viable sporozoites of Plasmodium berghei, a species that causes malaria in rodents. In the following decades, this work was extended to several other host species including humans. Individuals immunized with radiationattenuated sporozoites of P. falciparum develop a protective immunity that is sterile, long lived and prevents the development of any symptom of the disease (Hoffman et al. 2002). Because of these exceptional attributes, this type of immunity would be ideal for an effective vaccine against malaria.

In 1987 and 1988, two groups independently reported that the immunity induced in mice by radiation-attenuated sporozoites was dependent on CD8 T lymphocytes (Schofield et al. 1987, Weiss et al. 1988). It was the first evidence that this subpopulation of lymphocytes participates in the immunity against any form of a parasite. In the subsequent years, it was described that CD8 T cells also participate in immunity to infections caused by other intracellular parasites such as *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. In the case of *Leishmania* sp, the participation of CD8 T cells is more controversial; however, very recent studies have implicated CD8 T cells in the pathogenesis and immunity of certain types of cutaneous infection (Belkaid et al. 2002).

The definition of the importance of CD8 T lymphocytes in the immunity against these intracellular protozoan parasites has opened a new direction in the studies of the immunologic mechanisms of resistance to parasitic diseases. From a practical point of view, it may have important implications in the development of vaccines against these parasitic diseases.

## CD8 T CELLS AS AN IMPORTANT MECHANISM MEDIATING PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST INTRACELLULAR PARASITIC INFECTIONS

## MALARIA LIVER STAGES

The importance of CD8 T lymphocytes in the resistance to infection against a challenge with malaria sporozoites was demonstrated in several studies performed during the last 15 years. In initial studies, BALB/c mice immunized with radiation-attenuated sporozoites were depleted of CD8 T cells before a challenge with viable sporozoites of *P. yoelii*. CD8depleted immunized mice became completely susceptible to infection (Weiss et al. 1988). This study demonstrated that in the absence of CD8 T lymphocytes, other immunological mechanisms induced by radiation-attenuated sporozoites were not capable to promote resistance against the infection.

To further study the importance of CD8 T cells in the immunity to experimental malaria, T cell clones were obtained from spleen cells of BALB/c mice immunized with radiation-attenuated *P. yoelii* sporozoites. CD8 T cell clones were generated and characterized *in vitro* in terms of phenotype and specificity. These clones were Thy1+,  $\alpha\beta$  T-Cell Receptor+, CD4- and CD8+ and they recognized with high affinity a synthetic peptide represented by amino acids SYVPSAEQI present in the C-terminal portion of *P. yoelii* CS protein (Rodrigues et al. 1991).

In vitro these CD8 T cells presented intense lytic activity and capacity of inducing DNA degradation of H-2kd target cells in the presence of the malaria peptide. In addition, these cells secrete large amounts of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and the enzyme BLTesterase when stimulated by the antigen *in vitro* (Rodrigues et al. 1991, 1992). Most important, when adoptively transferred to naïve BALB/c mice, some of these clones were capable to provide specific immunity against the challenge with viable *P. yoelii* sporozoites (Rodrigues et al. 1991, 1992).

To demonstrate that liver stages of the malaria parasite were in fact targets for the immunity mediated by these CD8 T lymphocytes, an assay was developed to quantify the *P. yoelii* rRNA in RNA isolated from livers of mice infected with *P. yoelii*. Using this assay it was possible to demonstrate that there was a reduced amount of parasite rRNA in the liver of animals that received cells of a CD8 T cell clone 20 hours after the challenge with sporozoites. In contrast, control animals that did not receive T cells presented large amounts of parasite rRNA in their livers (Rodrigues et al. 1991).

CD8 T cells specific for epitopes present within the *P. falciparum* liver stage antigens have been commonly observed in humans immunized with radiation-attenuated sporozoites of *P. falciparum* (Doolan et al. 1997). Whether these cells are as important for human protective immunity as seen in the mouse model of infection cannot be directly addressed experimentally. Nevertheless, it is very likely that they actively participate in the protective immunity observed in human vaccinees.

During natural infection in humans, CD8 T cells specific for epitopes present within different plasmodial antigens have been detected in many individuals with previous contact with *P. falciparum* (Hill et al. 1992, Aidoo et al. 1995, Plebanski et al. 1997, Gonzalez et al. 2000). Because these individuals do not develop sterile immunity against reinfection, these CD8 T cells do not seem to provide a degree of protective immunity similar to the one observed in individuals vaccinated with radiationattenuated sporozoites of *P. falciparum*. Whether this is a matter of specificity or quantity of specific T cells it is unknown. Alternatively, mechanisms of parasite evasion of the immune response that are absent after immunization with radiation-attenuated sporozoites of *P. falciparum* may operate during natural human infection.

# TRYPANOSOMA CRUZI

The importance of CD8 T cells in the naturally acquired immunity to *T. cruzi* infection was determined by the use of genetically modified mice that do not express either MHC class I or the CD8 molecule. These two genetically deficient mouse strains are highly susceptible to infection, being unable to control acute parasitemia (Tarleton et al. 1992, Rottenberg et al. 1993).

Subsequent studies generated CD8 T-cell lines specific for an epitope of trypomastigote surface antigen-1 (TSA). These T-cell lines were Thy1+,  $\alpha\beta$  T-cell receptor+, CD4- and CD8+. *In vitro* these CD8 T cells presented intense lytic activity against *T. cruzi*-infected target cells. These cells also secreted large amounts of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  when stimulated with the antigen *in vitro* (Wizel et al. 1997). When adoptively transferred to naïve mice, they provided specific immunity against the challenge with infective forms of *T. cruzi* (Wizel et al. 1997).

*T. cruzi* is a parasite that persists for long periods of time causing a chronic inflammatory disease. Under certain circumstances T cells exacerbate the immune response causing an increase in tissue pathology or autoimmunity (Soares et al. 2001a). However, this autoimmune response has been associated with CD4 Th1 cells (dos Santos et al. 1992, Soares et al. 2001b).

As mentioned above, in the murine model, the adoptive transfer of large amounts of IFN- $\gamma$ producing CD8 T cells specific for a parasite epitope significantly reduced infection and promoted survival of mice against a lethal infection with *T*. *cruzi* (Wizel et al. 1997). These results indicate that IFN- $\gamma$ -producing CD8 T cells did not aggravate inflammatory reactions or autoimmunity, but rather promoted elimination of the parasites.

During natural infection in humans, CD8 T cells specific for *T. cruzi* have been detected in most individuals in the chronic phase of infection (Wizel et al. 1998b). Also, there is an association of an increase in CD8 T cells with the presence of *T. cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis (Higuchi et al. 1997).

Although it is difficult to prove definitively that these cells are important in host resistance, it is plausible to believe that they exert an antiparasitic role similar to that seen in the mouse model of infection.

# TOXOPLASMA GONDII

Early studies by the group of Kasper and collaborators demonstrated that mice and humans immune to *T. gondii* develop CD8 T cells that recognize parasite antigen presented by antigen-pulsed or infected target cells. These CD8 lymphocytes proliferate, secrete IFN- $\gamma$ , lyse the target cells and block the multiplication of parasites *in vitro* (Khan et al. 1988, 1990).

In subsequent years, the concept that CD8 T cells are a very important effector mechanism against this parasitic infection became well established (reviewed by Denkers and Gazzinelli 1998). In mice vaccinated with an attenuated strain of T. gondii (ts-4), the depletion of CD8 T cells was shown to partially abrogate resistance to infection with a highly virulent strain of the parasite. Among the  $\alpha\beta$ T lymphocytes, CD8 T cells seem to be the major effector mechanism because the depletion of CD4 T cells fails to produce any detectable loss of immunity. Nevertheless, both subpopulations of T lymphocytes cooperate in the immune response because the depletion of CD4 and CD8 T cells renders mice immunized with attenuated T. gondii ts-4 completely susceptible to infection (Gazzinelli et al. 1991).

The importance of CD8 T cells in the resistance to murine toxoplasmosis was confirmed in parallel studies in which CD4-depleted T lymphocytes were adoptively transferred to naïve athymic recipients. These cells (mainly CD8 cells) led to a significant increase in mouse survival after infection and a significant reduction in the formation of brain cysts (Parker et al. 1991). Finally, the importance of CD8 T cells was demonstrated by the adoptive transfer of T cell clones specific for a *T. gondii* antigen.  $\alpha\beta$  T-cell receptor+, CD4- and CD8+ T cells specific for the P30 (Sag1) antigen conferred a high degree of protective immunity against a lethal challenge with *T. gondii* (Khan et al. 1994).

Several lines of evidence implicate T lymphocytes in pathologic changes associated with acute infection in mice. Most evidence pointed at lymphocytes of the CD4 subset and granulocytes during this detrimental inflammatory response that can be the cause of death. Therefore, so far, CD8 T cells seem to be associated with a particularly beneficial immune response by the host, being unable to cause significant pathology (reviewed by Denkers and Gazzinelli 1998).

## LEISHMANIA SP.

Years of studies have been unable to firmly establish that CD8 T cells are required for naturally acquired immunity against Leishmania sp. This is not unexpected because it is well established that MHC class II restricted CD4 T cells are extremely dominant during the development of immunity against Leishmania sp. The importance of CD4 T cells was illustrated in studies using mice deficient for the expression of CD8 or class II MHC molecules. After primary subcutaneous infection with L. major, CD8deficient mice controlled the infection for over 1 year (Huber et al. 1998). On the other hand, mice genetically deficient for MHC class II are highly susceptible to infection (Locksley et al. 1993). These results support the notion that in the absence of CD8 T cells, other cell types (mainly class II restricted helper T cells) could provide an efficient control of a primary infection with L. major.

In spite of these earlier observations, very recent studies using low doses of *L. major* promastigotes inoculated into a dermal site (ear dermis) demonstrated that CD8 T-cell-deficient mice failed to control parasite growth. Also, these animals had a minor and delayed dermal pathology when compared to wild-type animals. In this model of infection, reconstitution of resistance was obtained when both CD4 and CD8 T cells were adoptively transferred. This study strongly suggests that CD8 T lymphocytes participate in both the pathology and immunity to primary infection with *L. major* in the skin (Belkaid et al. 2002).

These results are in agreement with a number of previous observations indicating that specific CD8 T cells are primed during natural infection or vaccination in humans. When re-stimulated *in vitro* with *Leishmania* antigens, human CD8 T cells secrete IFN- $\gamma$ , an important mediator of resistance against certain types of infection with *Leishmania* sp (De Luca et al. 1999, Bottrel et al. 2001, Pompeu et al. 2001). Also, in individuals that develop the mucocutaneous form of the disease, CD8 T lymphocytes are highly cytolytic *in vitro* against *Leishmania*-infected macrophages (Brodskyn et al. 1997).

Together with the evidence obtained recently with the murine model of infection, it seems that CD8 T cells participate in both the pathogenesis and immunity to cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*. Nevertheless, the importance of these cells in relation to CD4 T cells is far from clear and remains to be further elucidated.

## IDENTIFICATION OF THE EPITOPES RECOGNIZED BY PROTECTIVE CD8 T CELLS IN MICE AND HUMANS

# MALARIA LIVER STAGES

Initial studies using the mouse model of malaria searched for CD8 epitopes in the only protein that had its primary structure known at that time, the CS protein. As a source of CD8 lymphocytes, spleen cells of mice vaccinated with radiation-attenuated sporozoites were used because these animals develop strong protective immunity against the infection. So far, to our knowledge, in mice vaccinated with radiation-attenuated sporozoites, CD8 lymphocytes were specific for a single epitope found in the C-terminal region of the *P. berghei* or *P. yoelii* CS protein (Romero et al. 1989, Rodrigues et al. 1991, 1992). This epitope is recognized by CD8 T cells restricted by H-2 Kd molecules.

Figure 1 shows an outline of the *P. yoelii* CS protein with its different immunodominant epitopes recognized by antibodies (lymphocytes B) or CD4 or CD8 T lymphocytes. The epitopes of *P. yoelii* CS protein are important because the infectivity of *P. yoelii* sporozoites is comparable to that of *P. falciparum*, the most virulent human malaria parasite. Due to these characteristics, *P. yoelii* infection in mice is considered a valuable model for studies of preclinical development of subunit vaccines (see below).

Similar to the mouse studies, epitopes recognized by human CD8 T cells from individuals vaccinated with radiation-attenuated sporozoites of *P. falciparum* were initially identified within the CS protein of this human malaria parasite (Malik et al. 1991). In subsequent studies, CD8 epitopes were also found in several other distinct antigens expressed in liver stages of *P. falciparum* (Doolan et al. 1997, Wizel et al. 1995a,b, Kumar et al. 2001). Currently a total of 35 epitopes have been described in different liver stage proteins of *P. falciparum* recognized by CD8 T cells from individuals of diverse HLA haplotypes vaccinated with radiation-attenuated sporozoites (Table I).

In addition to CD8 epitopes recognized by T cells from individuals vaccinated with radiationattenuated sporozoites, other epitopes were determined using cells collected from individuals naturally exposed to malaria (Hill et al. 1992, Aidoo et al. 1995, Plebanski et al. 1997). A list of the CD8 epitopes described in the distinct liver stage antigens of *P. falciparum* is depicted in Table II. As can be noticed, some of these epitopes are common to the ones mapped in individuals vaccinated with radiation-attenuated sporozoites. New epitopes recognized by individuals of the HLA-A2.1 haplotype have been recently described suggesting that the number of CD8 epitopes might be underestimated (Gonzalez et al. 2000).

# TABLE I

Epitopes on P. falciparum liver stage proteins recognized by CD8 T cells from volunteers vaccinated with radiation-attenuated sporozoites of *P. falciparum*.

Protein	Residues	HLA	Sequence	Ref.
CS	368-390		KPKDELDYENDIEKKICKMEKCS	Malik et al. 1991
CS	310-319	A1.31	EPSDKHIKE	Kumar et al. 2001
CS	394-402	A2.386	GLIMVLSFL	Doolan et al. 1997
CS	7-16	A2.7	ILSVSSFLFV	Doolan et al. 1997
CS	344-353	A3/11.336	VTCGNGIQVR	Doolan et al. 1997
CS	285-294	B7.285	MPNDPNRNV	Doolan et al. 1997
TRAP	1-15	A2	MNHLGNVKYLVIVFL	Wizel et al. 1995b
TRAP	46-60	A2	EVDLYLLMDCSGSIR	Wizel et al. 1995b
TRAP	121-135	A2	LLSTNLPYGKTNLTD	Wizel et al. 1995b
TRAP	126-140	A2	LPYGKTNLTDALLQV	Wizel et al. 1995b
TRAP	131-145	A2	TNLTDALLQVRKHLN	Wizel et al. 1995b
TRAP	136-150	A2	ALLQVRKHLNDRINR	Wizel et al. 1995b
TRAP	221-235	A2	ENVKNVIGPFMKAVC	Wizel et al. 1995b
TRAP	281-295	A2	CEEERCLPKREPLDV	Wizel et al. 1995b
TRAP	286-300	A2	CLPKREPLDVPDEPE	Wizel et al. 1995b
TRAP	521-535	A2	ALLACAGLAYKFVVP	Wizel et al. 1995b
TRAP	546-560	A2	APFDETLGEEDKDLD	Wizel et al. 1995b
TRAP	551-565	A2	TLGEEDKDLDEPEQF	Wizel et al. 1995b
TRAP	107-115	B8	ASKNKEKAL	Kumar et al. 2001
TRAP	109-117	B8	KNKEKALII	Kumar et al. 2001
TRAP	14-23	A2	FLIFFDLFLV	Doolan et al. 1997
TRAP	522-531	A3	LLACAGLAYK	Doolan et al. 1997
TRAP	523-531	A3	LACAGLAYK	Doolan et al. 1997
TRAP	539-548	B7	TPYAGEPAPF	Doolan et al. 1997
EXP1	80-88	A2	VLAGLLGNV	Doolan et al. 1997
EXP1	2-10	A2	KILSVFFLA	Doolan et al. 1997
EXP1	83-91	A2	GLLGNVSTV	Doolan et al. 1997
EXP1	91-100	A2	VLLGGVGLVL	Doolan et al. 1997
EXP1	10-18	A3	ALFFIIFNK	Doolan et al. 1997
LSA1	94-102	A3	QTNFKSLLR	Doolan et al. 1997
LSA1	105-113	A3	GVSENIFLK	Doolan et al. 1997
LSA1	59-68	A3	HVLSHNSYEK	Doolan et al. 1997
LSA1	11-20	A3	FILVNLLIFH	Doolan et al. 1997
PfS16	77-85	B7	MPLETQLAI	Doolan et al. 1997

Adapted from Kumar et al. 2001. Abbreviations: CS (circumsporozoite protein), TRAP (Thrombospondin Related Anonymous Protein), EXP1 (Excreted Protein-1), LSA1 (Liver Stage Antigen-1) and PfS16 (P. falciparum Surface antigen of 16 kDa).

.



# CS Protein of Plasmodium yoelii

Fig. 1 - CS protein of Plasmodium yoelii.

ТА	BL	Æ	II

Epitopes on *P. falciparum* liver stage proteins recognized by CD8 T cells from individuals naturally exposed to sporozoites of *P. falciparum* 

Protein	Residues	HLA	Sequence	Responder/	Ref.
				total	
CS	368-375	B35	KPKDELDY	3/15	Hill et
			K <u>S</u> KDELDY	1/10	al. 1992
CS	300-308	B7	MPNDPNRNV	1/6	Aidoo et al. 1995
CS	105-13	B8	LRKPKHKKL	2/11	Aidoo et al. 1995
TRAP	3-11	A2.1	HLGNKYLV	2/7	Aidoo et al. 1995
TRAP	500-08	A2.1	GIAGGLALL	2/7	Aidoo et al. 1995
TRAP	107-15	B8	ASKNKEKAL	1/11	Aidoo et al. 1995
TRAP	109-17	B8	KNKEKALII	2/11	Aidoo et al. 1995
LSA1	1786-94	B53	KPIVQYDNF	4/14	Hill et al. 1992
LSA1	1850-7	B35	KPNDKSLY	1/15	Hill et al. 1992
LSA1	1854-61	B17	KSLYDEHI	2/5	Aidoo et al. 1995
STARP	523-31	A2.2	MINAYLDKL	1/5	Aidoo et al. 1995

Adapted from Aidoo et al. 1995 and Plebanski et al. 1997. Abbreviations: CS (circumsporozoite protein), TRAP (Thrombospondin Related Anonymous Protein), LSA1 (Liver Stage Antigen-1) and STARP (sporozoite threonine/asparagine-rich protein).

The identification of these CD8 epitopes is the basis for the development of multi-antigen subunit vaccines aimed at the induction of CD8 T cells in humans (see below).

## TRYPANOSOMA CRUZI

Spleen cells from mice chronically infected with *T. cruzi* were used to identify a number of epitopes recognized by mouse H-2Kb restricted CD8 T cells. These epitopes were located within the trypomastig-

ote surface antigen-1 (TSA-1) and amastigote surface protein -1 or 2 (ASP-1 or ASP2, respectively, Wizel et al. 1997, Low et al. 1998). In addition, a CD8 T cell epitope was located in the *trans*-sialidase of *T. cruzi* by using spleen cells from mice immunized with plasmid DNA (Rodrigues et al. 1999). Table III contains a list of the murine CD8 epitopes that have been described so far.

Similar to mice, humans with the HLA-A2.1 haplotype chronically infected with *T. cruzi* also displayed CD8 T cells specific for epitopes within the TSA-1, ASP-1 or ASP-2 antigen (Wizel et al. 1998b, Table IV). Recently, epitopes recognized by humans with the HLA-A2.1 haplotype have been determined in the trypomastigote-secreted antigens FL-160 and cruzipain (E. Cunha-Neto, personal communication).

# TOXOPLASMA GONDII AND LEISHMANIA SP.

Few publications have studied the antigens that are target of CD8 T cells specific for *T. gondii*. Khan et al. (1988), using spleen cells from infected mice, demonstrated the presence of CD8 T cells specific for the purified membrane protein denominated P30 or Surface Antigen 1 (SAG1). This result was confirmed by the immunization with native protein that elicited protective immunity dependent on the activation of this subpopulation of lymphocytes (Khan et al. 1991). CD8 T cell clones specific for the purified P30 antigen (SAG1) were generated and, when adoptively transferred to naive mice, protected them against acute infection with *T. gondii* (Khan et al. 1994).

In recent studies a putative CD8 T cell epitope recognized by spleen cells of mice immunized with a plasmid DNA containing the SAG1gene was identified. This epitope is represented by amino acids AESKSVII and it is possibly recognized by CD8 T cells restricted by H-2Kk (Nielsen et al. 1999).

In humans with the HLA-A\*0201 haplotype, one epitope recognized by CD8 T cells was also identified within the SAG1 antigen. A peptide representing amino acids 289-297 (SPEKHHCTV) was recognized by HLA-A\*0201 restricted human CD8 T cells that lysed *T. gondii*-infected target cells (Yano et al. 1997).

CD8 T cells specific for a single antigen (GP46/M-2) expressed in *Leishmania amazonen*sis were shown to recognize *Leishmania*-infected macrophages (Kima et al. 1997). However, no subsequent epitope mapping was performed.

# CONDITIONS OF *IN VIVO* PRIMING AND EXPANSION OF PROTECTIVE CD8 T CELLS

The immune response is initiated when antigenic fragments (epitopes) of pathogen-derived proteins are presented by the molecules of the major histocompatibility complex (MHC). While MHC class I products are responsible for the presentation to classic CD8 cytotoxic T cells, MHC class II products will prime classic CD4 helper T cells.

Entry into the class I-restricted pathway of antigen presentation usually occurs through the presence of the antigenic proteins in the cytosol of antigen- presenting cells. In addition, dendritic cells can ingest proteins and have them processed and presented by the MHC class I pathway. The MHC class II pathway is mostly centered on peptides generated in the endocytic pathway. A detailed description of the MHC class I or class II pathways of antigen presentation can be found elsewhere (reviewed by Ploegh 1998).

The conditions of priming and expansion of CD8 T cells specific for any of these parasitic antigens during infection are completely obscure. It is unknown whether priming occurs through infection or antigen-pulsing of antigen-presenting cells, or by cross priming. Cross priming occurs when dendritic cells or macrophages take up cell-associated antigens and present them in the context of MHC class I molecules to classic CD8 T cells. This pathway of antigen presentation is particularly important when the antigen is not expressed in dendritic cells or macrophages. It will be very important in the future to characterize in detail the priming conditions of CD8 T cells specific for the different parasitic antigens.

The role of CD4 T cells in the priming and/or

## TABLE III

Peptide	Protein	Residues	H2	Sequence	Ref.
Pep77.2	TSA-1	515-522	Kb	VDYNFTIV	Wizel et al. 1997
PA14	ASP-1	509-516	Kb	VNHDFTVV	Low et al. 1998
PA5	ASP-2	285-292	Kb	KNYPFSSI	Low et al. 1998
PA6	ASP-2	274-281	Kb	NTLVFPLV	Low et al. 1998
PA7	ASP-2	545-552	Kb	DNRQYSFV	Low et al. 1998
PA8	ASP-2	552-559	Kb	VNHRFTLV	Low et al. 1998
PA10	ASP-2	399-409	Db/Kb	EKEANALYLWV	Low et al. 1998
TS359-367	TCTS	359-367	Kd	IYNVGQVSI	Rodrigues et al. 1999
P5	LYT1	190-198	Kb	ELTMYKQLL	Fralish and Tarleton 2003

Epitopes of Trypanosoma cruzi recognized by mouse CD8 T cells.

Adapted from Low et al. 1998. Abbreviations: TSA-1 (Trypomastigote Surface Antigen-1), ASP-1(Amastigote Surface Protein-1), ASP-2 (Amastigote Surface Protein-2) and TCTS (*T. cruzi* trans-sialidase).

expansion of specific CD8 T cells was addressed in few studies. CD4 T cells were important for the development of CD8 T cells specific for both *T. gondii* and malaria parasites (Gazzinelli et al. 1991, Parker et al. 1991). In the case of malaria (*P. yoelii*), it was possible to elegantly demonstrate that IL-4 secreted by CD4 T cells was crucial for the maturation, but not for the initial proliferation of specific CD8 T cells (Carvalho et al. 2002).

## CHARACTERIZATION OF THE IN VIVO EFFECTOR MECHANISMS MEDIATED BY PROTECTIVE CD8 T CELLS

## MALARIA LIVER STAGES

To elucidate the role of IFN- $\gamma$  as an immunological mechanism used by CD8 T cells to eliminate the liver stages of malaria parasites *in vivo*, studies were performed in mice genetically deficient for the IFN- $\gamma$  receptor. After a single dose of radiationattenuated sporozoites, these mice do not develop protective immunity against malaria liver stages. In contrast, wild type mice display remarkable immunity against these forms of malaria (Tsuji et al. 1995). This experimental evidence strongly argues for the fact that after a single immunization with radiation-attenuated sporozoites, CD8 T cells use IFN- $\gamma$ -dependent mechanism(s) to eliminate malaria liver stages. Because IFN- $\gamma$  is a potent inducer of nitric oxide (NO) in mice, a similar approach was used to determine whether NO could mediate elimination of malaria liver stages. Unexpectedly, NO synthase 2 (NOS2)-deficient mice develop protective immunity in a manner similar to wild type animals (M. Tsuji, personal communication).

In spite of the IFN- $\gamma$  dependence detected after a single immunization with radiation-attenuated sporozoites, after several doses of this immunogen, strong protective immunity can develop in mice genetically deficient for the IFN- $\gamma$  receptor (Tsuji et al. 1995). The presence of IFN- $\gamma$  independent mechanisms was confirmed by the observations that CD8 T cell clones, as well as CD8 T cells induced by immunization with a recombinant adenovirus, did not require a functional IFN- $\gamma$  receptor to eliminate liver stages of *P. yoelii* (Rodrigues et al. 2000a). The downstream molecules activated by IFN- $\gamma$ , as well as the nature of the IFN- $\gamma$ -independent mechanisms remains completely unknown at present.

#### TRYPANOSOMA CRUZI

Although there are several lines of evidence showing that CD8 T cells participate in the protective immunity against experimental *T. cruzi* infection, the pre-

#### TABLE IV

Peptide	Sequence	Frequency of responders		
		Positive/total	%	
TSA-1(818-826)	VLLPSLFLL	3/4	75	
TSA-1(818-827)	VLLPSLFLLL	18/21	86	
TSA-1(89)	KLFPEVIDL	9/13	69	
TSA-1(514)	FVDYNFTIV	17/21	81	
ASP-1(668)	LLGLWGLTGL	14/18	78	
ASP-1(666)	LLLLGLWGL	3/4	75	
ASP-1(50)	VLAKDGTEV	13/18	72	
ASP-1(71)	IAGGVMAVV	4/4	100	
ASP-1(508)	FVNHDFTVV	6/7	86	
ASP-2(302)	WVFPESISPV	4/4	100	
ASP-2(551)	FVNHRFTLV	1/4	25	

Epitopes on *T. cruzi* proteins recognized by CD8 cells from individuals HLA-A2.1 chronically infected.

Adapted from Wizel et al. 1998b. Abbreviations: TSA-1 (Trypomastigote Surface Antigen-1), ASP-1(Amastigote Surface Protein-1), ASP-2 and (Amastigote Surface Protein-2).

cise mechanism(s) used by these cells to eliminate *T. cruzi* has(ve) not been defined.

The fact that CD8 T cells secrete IFN- $\gamma$  may suggest that this mechanism may be relevant to the elimination of intracellular forms of the parasite. IFN- $\gamma$  is an important mediator of naturally acquired immunity against the infection. Genetically deficient mice that do not express the IFN- $\gamma$  receptor or Stat4 are unable to control *T. cruzi* infection (Holscher et al. 1998, Tarleton et al. 2000). However, a direct link between IFN- $\gamma$  secretion by CD8 T cells and the *in vivo* antiparasitic activity of these cells has not been provided so far.

The IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms are at least in part mediated by the production of NO. In the absence of IFN- $\gamma$  receptors, NO is not produced by macrophages, suggesting that IFN- $\gamma$  is the main inducer of NOS2 activation. The evidence that NO is critical for the elimination of *T. cruzi* during acute experimental infection was obtained with genetically deficient mice that do not express NOS2. These animals are highly susceptible to infection with different parasite strains (Holscher et al. 1998, Rodrigues et al. 2000b).

In addition to producing IFN- $\gamma$ , CD8 T cells can lyse host cells infected with T. cruzi, or secrete other potentially active mediators such as TNF- $\alpha$ , granulisin or a number of different chemokines (Munoz-Fernandez et al. 1992, Aliberti et al. 1999, Stenger et al. 1999). In fact, CD8 T cells specific for amastigote or trypomastigote antigens are capable of lysing non-phagocytic cells infected with T. cruzi in vitro (Wizel et al. 1997, Low et al. 1998). However, it is unclear whether lysis and DNA degradation of infected target cells by CD8 T cells can be an effective mechanism to restrain T. cruzi infection in vivo. Genetically deficient mice that do not express perforin or granzyme B are not more susceptible to infection than wild type animals (Kumar and Tarleton 1998). These observations argue for the fact that in the absence of perforin- or granzyme B-mediated lysis other mechanism(s) can provide resistance against T. cruzi infection in mice. The elucidation of the anti-parasitic mechanisms medi-

453

ated by *T. cruzi*-specific CD8 T cells will require further investigation using more complex experimental models.

## TOXOPLASMA GONDII

The participation of IFN- $\gamma$  as an important immunological mechanism used by immune cells to eliminate tachyzoites of T. gondii was determined initially by the treatment of mice with specific neutralizing monoclonal antibodies. Mice injected with a monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  succumb due to acute toxoplasmosis. In contrast, animals that received control antibodies survived infection and developed chronic infection (Suzuki et al. 1988). In subsequent studies, it was shown that treatment with neutralizing monoclonal antibodies had the ability to dramatically change the resistant phenotype of mice vaccinated with an attenuated strain of T. gondii (Gazzinelli et al. 1991). Using genetically modified mice that do not express IFN- $\gamma$ , it became clear that this cytokine is crucial for the resistance against acute toxoplamosis in mice (Denkers et al. 1997). Because the resistance elicited by vaccination with attenuated parasites had been previously thought to be partially dependent on CD8 T cells, it was plausible to assume that the IFN- $\gamma$  was secreted in part by these cells.

However, the most compelling evidence showing the importance of IFN- $\gamma$  produced by CD8 T cells in mediating resistance to murine acute toxoplasmosis was obtained by the adoptive transfer of protective immunity by CD8 T cell clones specific for *T. gondii*. The treatment with specific neutralizing monoclonal antibodies to mouse IFN- $\gamma$  completely reversed the immunity mediated by these T cells in naïve mice (Khan et al. 1994).

The IFN- $\gamma$  secreted by CD4, CD8 and NK cells has the ability to activate *in vivo* nonhematopoietic or hematopoietic cells to eliminate intracellular *T. gondii* parasites. Using mouse bone marrow chimeras between wild-type and IFN- $\gamma$  receptordeficient mice, Yap and Sher (1999) elegantly demonstrated that both cell types have to express the IFN- $\gamma$  receptor to provide efficient immunity to acute and persistent infection.

Because IFN- $\gamma$  is a major inducer of NO synthesis by phagocytic cells, the participation of NOS2 was evaluated with the aid of genetically modified mice deficient for the expression of this enzyme. NOS2-deficient mice infected with an avirulent strain of *T. gondii* die at approximately 21 to 30 days postinfection. Death was associated with large numbers of cysts and tachyzoites suggesting the importance of NO in the control of chronic infection. A similar observation was made in mice genetically deficient for IFN- $\gamma$  Regulatory Factor-1, the main regulator of IFN- $\gamma$ -induced NO (reviewed by Denkers and Gazzinelli 1998).

Using mouse bone marrow chimeras between wild type and NOS2-deficient mice, it was possible to determine that NO synthesis was important for the control of tachyzoite replication in infected hematopoietic but not in non-hematopoietic cells (Yap and Sher 1999).

In spite of the importance of reactive nitrogen intermediates in the control of the chronic stage of infection, several lines of evidence strongly indicate that IFN- $\gamma$  induces other antiparasitic mechanisms independent of NO during murine toxoplasmosis. First, IFN- $\gamma$ -deficient mice die much earlier (less than 10 days post-infection) than NOS2deficient animals. Also, NOS2-deficient mice vaccinated with the ts-4 strain were protected against a challenge with a virulent T. gondii strain (Khan et al. 1998). This protective immunity had been previously shown to be entirely dependent on IFN- $\gamma$  (Denkers and Gazzinelli 1998). Finally, nonhematopoietic cells deficient in the expression of NOS2 can efficiently control parasite multiplication in vivo (Yap and Sher 1999).

Other possible mechanisms operating *in vivo* in the control of acute toxoplasmosis can be the release of reactive oxygen intermediates or tryptophan degradation (reviewed by Denkers and Gazzinelli 1998). There is also evidence of a third still unknown mechanism of intracellular *T. gondii* elimination. Murine astrocytes can be activated by IFN- $\gamma$  to eliminate intracellular forms of *T. gondii*. The

elimination of these parasites does not depend on reactive oxygen intermediates, NO or tryptophan degradation (Halonen and Weiss 2000). Whether or not these mechanisms operate *in vivo* and which one is the most relevant is still unknown.

As mentioned above, in addition to secreting IFN- $\gamma$ , *T. gondii*-specific CD8 effector lymphocytes from immune mice or humans are capable of efficiently lysing parasite-infected target cells. The requirement for IFN- $\gamma$  in immunity to *T. gondii* has made it difficult to evaluate the contribution of the lytic activity of CD8 T cells to the resistance to infection.

To determine the importance of perforin as a mediator of the CD8 T cell-mediated immune response, perforin-deficient mice were infected with *T. gondii*. After vaccination with the ts-4 strain, resistance to acute infection was as good in perforindeficient mice as in wild type animals. In the chronic phase of infection there was a 3- to 4-fold increase in the number of cysts in mice infected with a non-lethal strain of *T. gondii*. This result indicates that a perforin-mediated mechanism may operate in the elimination of the brain cysts observed during the chronic stages of mouse infection (Denkers et al. 1997).

# GENERATION OF SUBUNIT VACCINES CONTAINING EPITOPES RECOGNIZED BY PROTECTIVE CD8 T CELLS AND PRECLINICAL EFFICACY TRIALS IN EXPERIMENTAL MODELS

# MALARIA LIVER STAGES

The fact that CD8 T cells are potent inhibitors of malaria liver stages and the characterization of epitopes recognized by these CD8 T lymphocytes prompted many investigators to explore whether induction of these T cells by subunit vaccines could be a feasible strategy for vaccination against malaria. A number of delivery systems have been used thus far to induce mouse CD8 T lymphocytes specific for the malarial epitope. They include recombinant viruses, bacteria, plasmid DNA, virus-like particles and synthetic peptides.

Recombinant viruses are the single class of im-

munogens that have been most systematically studied. Several recombinant viruses were used as vectors to elicit specific CD8 T cells and protective immunity in BALB/c mice against a challenge with sporozoites of *P. yoelii*. From these studies it became clear that, when used individually, distinct viral vectors expressing a malarial CD8 epitope provided variable degrees of protective immunity against liver stages of *P. yoelii* (reviewed by Soares and Rodrigues 1998).

When used alone in a single immunization dose, the replication-defective recombinant adenovirus containing the entire P. yoelii CS protein gene was shown to be the most efficient vector capable of reducing the development of liver stages of P. yoelii by  $\sim$  94%. Immunity was largely mediated by CD8 T lymphocytes, but CD4 T cells also participate in this process. Nevertheless, complete protection against malaria could only be observed in 40% of the mice challenged with P. yoelii sporozoites (Rodrigues et al. 1997). In very recent studies, the immunogenicity and protective efficacy of the recombinant adenoviral vector was improved by a simultaneous injection of the Natural Killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide. Under these circumstances, complete protection against infection with P. yoelii sporozoites was achieved in 80% of BALB/c mice (Gonzalez-Aseguinolaza et al. 2002).

Immunization with other recombinant viruses elicited CD8 T cells specific for the malarial epitope; however, the degree of elimination of malaria liver stage was lower than that observed with the adenoviral vector. Table V summarizes the results obtained after a single immunization with a variety of recombinant viral vectors.

Due to the limited degree of protective immunity observed after immunization with a single recombinant virus, studies were performed to improve protective immunity using sequential immunization with two different viral vectors expressing the same CD8 T-cell epitope for priming and boosting. This strategy has been denominated heterologous primeboost immunization regimen.

Earlier studies performed with recombi-

		6			
Recombinant	Foreign gene	Liver	Complete	Immunological	Reference
virus		stage	protection	mechanism of	
		inhibition	of BALB/c	protection	
			mice		
Adenovirus +	Entire CS protein	>95%	80%	CD8 and CD4 T cells	Gonzalez-
$\alpha$ -galactosyl					Aseguinolaza
ceramide					et al. 2002
Adenovirus	Entire CS protein	94%	40%	CD8 and CD4 T cells	Rodrigues et al. 1997
Sindbis	CD8 epitope	$\sim 75\%$	0%	CD8 T cells	Tsuji et al. 1998
Vaccinia	CD8 epitope	$\sim 75\%$	0%	CD8 T cells	Rodrigues et al. 1994
Vaccinia	Entire CS protein	$\sim 55\%$	0%	?	Li et al. 1993
Influenza	CD8 epitope	<10%	0%	None	Li et al. 1993

TABLE V Summary of experiments using a single recombinant virus to elicit immunological elimination of liver stages of *Plasmodium voelii*.

nant viruses expressing the *P. yoelii* malarial epitope showed that heterologous prime-boost immunization with recombinant influenza virus followed by recombinant vaccinia virus elicited a high degree of protective immunity against malaria infection (Li et al. 1993, Rodrigues et al. 1994). A similar protective immunity could not be achieved with two doses of only recombinant influenza or vaccinia viruses. Table VI summarizes the results obtained using different heterologous prime-boost immunization regimes to elicit immunological elimination of liver stages of *P. yoelii* and protective immunity against malaria.

This unexpected observation was explained by the fact that mice immunized with the combination of these two different carrier viruses had a frequency of epitope-specific CD8 T-cells more than 20 times higher than animals immunized twice with one of these recombinant viruses (Murata et al. 1996).

In figure 2 there is an example of the synergistic effect observed after the heterologous prime-boost immunization with recombinant influenza virus followed by recombinant vaccinia virus expressing the malarial epitope. As it can be noticed there is an increase of more than 40 folds in the number of malaria peptide specific CD8 T cells.

The expansion of epitope-specific CD8 T-cells

depends on the sequence of immunization with these two viruses. In mice primed with recombinant vaccinia virus followed by a booster injection with recombinant influenza virus, the frequency of CD8 T-cells was 10 times lower than after priming with influenza virus followed by a vaccinia virus booster (Figure 2 and Murata et al. 1996). No protective immunity could be observed in this case (Li et al. 1993). These findings were recently extended to other malaria CD8 epitopes expressed in the CS protein of *P. falciparum*, a human malaria parasite (Miyahira et al. 1998).

Based on these observations, several authors have explored the heterologous prime-boost immunization to increase the CD8 immune response. Independently performed studies using two distinct rodent malaria parasites, *P. yoelii* and *P. berghei*, observed that the heterologous prime-boost immunization regimes with a plasmid containing the CS gene followed by injection with recombinant vaccinia virus greatly enhanced the specific CD8 T cell response. This protocol of immunization did not only lead to a significant increase in the CD8 immune response, but also provided a significant degree of protection against a challenge with *P. berghei* or *P. yoelii* sporozoites (Table VI and Schneider et al. 1998, Sedegah et al. 1998).

#### TABLE VI

Summary of experiments using heterologous prime/boost regimes to elicit immunological elimination of liver stages a	nd
complete protection against challenge with <i>Plasmodium voelli</i> sporozoites.	

Recombinant viruses,		Complete	Immunological	Ref.
particles of DNA		protection of	mechanism of	
Boost	inhibition	BALB/c mice	protection	
Vaccinia	100%	100%	CD8 and CD4	Bruna-Romero
Entire CS protein			T cells	et al. 2001
Vaccinia	?	80-87.5%	CD8 T cells	Sedegah et al. 2000
Entire CS protein				
Vaccinia	?	50-69%	CD8 T cells	Sedegah et al. 1998
Entire CS protein				
Vaccinia	>95%	62%	CD8 T cells	Oliveira-Ferreira
Entire CS protein				et al. 2000
Vaccinia	>95%	60%	CD8 T cells	Li et al. 1993
Entire CS protein				
Vaccinia	>95%	?	CD8 T cells	Rodrigues et al. 1994
Entire CS protein				
Influenza	<10%	0%	None	Li et al. 1993
CD8 epitope				
Plasmid	?	13%	None	Sedegah et al. 1998
Entire CS protein				
	nt viruses, of DNA Boost Vaccinia Entire CS protein Vaccinia Entire CS protein Vaccinia Entire CS protein Vaccinia Entire CS protein Vaccinia Entire CS protein Vaccinia Entire CS protein CD8 epitope Plasmid Entire CS protein	nt viruses, I Liver of DNA stage inhibition Naccinia 100% Entire CS protein CVaccinia ? Entire CS protein Naccinia ? Entire CS protein Naccinia >95% Entire CS protein Naccinia >95% Entire CS protein Naccinia >95% Entire CS protein Influenza <10% CD8 epitope ?	nt viruses, of DNALiver stage protection of BALB/c miceBoostinhibitionBALB/c miceWaccinia100%100%Entire CS protein?80-87.5%Entire CS protein?80-87.5%Entire CS protein?50-69%Entire CS protein?50-69%Entire CS protein?62%Entire CS protein?60%Entire CS protein?60%Entire CS protein?60%Entire CS protein??Vaccinia>95%60%Entire CS protein??Influenza<10%	nt viruses, of DNALiver stageComplete protection of BALB/c miceImmunological mechanism of protectionBoostinhibitionBALB/c miceprotectionVaccinia100%100%CD8 and CD4 T cellsEntire CS protein?80-87.5%CD8 T cellsVaccinia?50-69%CD8 T cellsEntire CS protein?50-69%CD8 T cellsEntire CS protein?50-69%CD8 T cellsEntire CS protein?62%CD8 T cellsEntire CS protein?60%CD8 T cellsEntire CS protein?60%CD8 T cellsEntire CS protein?60%CD8 T cellsEntire CS protein?60%NoneVaccinia>95%60%NoneEntire CS protein??NonePlasmid?13%None

The increase in frequency of specific CD8 cells was dependent on the order of immunization. Priming with recombinant vaccinia virus followed by a booster injection of DNA did not evoke a significant increase in the frequency of specific CD8 T-cells or protection against malaria infection (Table VI and Schneider et al. 1998, Sedegah et al. 1998).

The immunogenicity of DNA vaccines can be further enhanced by co-immunization with plasmids containing genes of cytokines or co-stimulatory molecules of the immune system. Using *P. yoelii* infection, it was possible to demonstrate that coadministration of a plasmid containing the gene of murine GM-CSF enhanced both the CD8 response and the protective immunity to malaria in mice immunized with the CS gene and subsequently boosted with a recombinant vaccinia virus (Table VI and Sedegah et al. 2000).

Also using murine malaria as a vaccination model, it has been shown that priming with recom-

binant virus-like particles derived from a yeast retrotransposon (TyVLPs) containing the *P. berghei* or *P. yoelii* CS CD8 epitope could only induce strong CD8 T cell responses and protective immunity to malaria when followed by a booster injection with the recombinant vaccinia virus expressing the *P. berghei* or *P. yoelii* CS protein (Table VI and Plebanski et al. 1998, Oliveira-Ferreira et al. 2000).

Very recently, total inhibition of liver stage development and 100% protection against malaria was obtained in mice primed with the recombinant adenovirus expressing the *P. yoelii* CS protein, followed by a booster injection with a recombinant vaccinia virus expressing this same antigen. This protocol of immunization led to increased numbers specific CD8 and CD4 T cells, high anti-sporozoite antibody titers, and 100% protection of BALB/c mice when the time between priming and boosting with these two vectors was extended from 2 to 8 weeks. Most importantly, this immunization proto-



### Heterologous prime-boost regimen of immunization

Fig. 2 – **Influenza Epi-CD8** – Recombinant Influenza virus containing the CD8 epitope of *P. yoelii* CS protein (SYVPSAEQI). **Vaccinia PYCS** – Recombinant Vaccinia virus containing the entire gene of *P. yoelii* CS protein. Adapted from Murata et al. 1996.

col elicited long-lasting protective immunity against experimental infection (Table VI and Bruna-Romero et al. 2001).

In addition to malaria, similar observations have been made in several experimental models, thereby confirming the potential of the heterologous prime-boost immunization regimen to enhance the specific immune response against multiple pathogens (reviewed by Zavala et al. 2001). It is also important to point out that this increase in the frequency of specific CD8 T cells described initially in mice was recently confirmed in several types of non-human primates (Kent et al. 1998, Robinson et al. 1999, Hanke et al. 1999, Allen et al. 2000).

## TRYPANOSOMA CRUZI

The recent identification of epitopes recognized by *T. cruzi*-specific CD8 T lymphocytes has led to studies aiming at the development of subunit vaccines against experimental Chagas' disease. So far, to our

knowledge, the only delivery system used to induce *T. cruzi*-specific CD8 T lymphocytes was plasmid DNA.

DNA vaccination studies were performed with 3 distinct genes of T. cruzi encoding for major surface antigens of trypomastigote forms of this parasite. In studies conducted in our laboratory we used a gene encoding for the catalytic domain of the enzyme trans-sialidase (TS). Immunization of BALB/c mice with the TS gene elicited specific antibodies and promoted T-cell activation (Costa et al. 1998). The T-cell immune response was later characterized as being mediated mainly by CD4 Th1 and CD8 TC1 cells, which secreted a large amount of IFN- $\gamma$ , but not IL-4 or IL-10 (Rodrigues et al. 1999). Upon challenge with infective T. cruzi trypomastigotes, immunized mice showed a significant reduction in parasitemia and survived acute lethal infection (Costa et al. 1998).

Parallel studies were performed on BALB/c and C57BL/6 mice immunized with plasmids containing the TSA-1 gene. DNA vaccination was shown to generate antibodies, as well as CD8 T cells specific for parasitic epitopes. After challenge with *T. cruzi* trypomastigotes, a significant reduction in parasitemia was observed in C57Bl/6 mice, but not in BALB/c mice. Nevertheless, in both cases the DNA-vaccinated mice were more likely to survive acute infection than mice injected with the plasmid vector alone (Wizel et al. 1998a).

DNA-based immunization was also performed with a plasmid containing the gene of *T. cruzi* complement regulatory protein. This study demonstrated that both recombinant protein and DNA immunization could elicit activation of specific CD4 T cells. However, only DNA immunization could confer protective immunity on BALB/c mice. Based on that comparison, the authors proposed that CD8 T cell activation occurring during DNA immunization could be important for the protective immunity observed (Sepulveda et al. 2000).

Most recently, studies were carried out with genes encoding antigens expressed by the intracellular replicative forms of *T. cruzi*. They demonstrated

that the genes encoding ASP-1, ASP-2 and LYT1 could provide a high degree of protective immunity against experimental infection (Garg and Tarleton 2002 and Fralish and Tarleton 2003).

From mice immunized with the TS gene, we isolated CD4 Th1 and CD8 Tc1 clones which displayed remarkable antiparasitic activities *in vitro* (Rodrigues et al. 1999, 2000b). Because DNA immunization with the TS gene could elicit distinct immunological mechanisms, we considered that a detailed comparison of the immunogenicity of plasmids containing either the entire TS gene or DNA sequences encoding its immunogenic portions would be important. For that purpose, the levels of T cell response and protective immunity against experimental infection were evaluated in mice immunized with plasmids containing DNA sequences encoding either the TS CD4 or CD8 or both T-cell epitopes.

Distinct plasmids containing DNA sequences encoding both TS CD4 and CD8 T-cell epitopes could provide a degree of immunity sufficient to reduce the parasitemia and mortality of DNAimmunized animals caused by a lethal challenge with *T. cruzi*. On the other hand, plasmids expressing either CD4 or CD8 T-cell epitopes of TS were unable to provide a similar degree of protective immunity against infection (Table VII). These observations suggest that activation of CD4 Th1 and CD8Tc1 T cells are important for host immunoprotection induced by immunization with a DNA subunit vaccine (Fujimura et al. 2001).

## TOXOPLASMA GONDII AND LEISHMANIA SP.

The fact that no clear epitope recognized by CD8 T cells has been characterized in *T. gondii* or *Leishmania* sp. precludes testing of subunit vaccines in experimental models. Several reports using plasmid immunization have been able to demonstrate heterogeneous degrees of protective immunity against *T. gondii* infection in immunized mice. These studies used genes encoding the antigens SAG1, GRA1, GRA7 and ROP2.

Although DNA immunization can elicit some degree of protective immunity, the activation of spe-

cific CD8 T cells has been poorly or not at all characterized (Nielsen et al. 1999, Angus et al. 2000, Vercammen et al. 2000, Desolme et al. 2000). Whether subunit vaccines may induce protective CD8 T cells specific for these antigen remains to be further characterized in the future.

In *Leishmania major*, s.c. immunization with a plasmid containing the gene coding *L. major* LACK elicited protective immunity against infection in a highly susceptible mouse strain (BALB/c). The protective immunity detected was mostly mediated by specific CD4 Th1 cells, although protective immunity was also partly dependent on CD8 T lymphocytes (Gurunathan et al. 1997). A further evaluation of the role of CD8 T cells found that they may function as helpers for the development of effector CD4 T cells. No evidence so far has indicated that the participation of CD8 T cells in protective immunity against *L. major* is related to their effector function (Gurunathan et al. 2000). Also, a CD8 T-cell epitope is yet to be identified within the LACK antigen.

## HUMAN CLINICAL TRIALS USING SUBUNIT VACCINES

The successful results of preclinical vaccination studies performed on rodent malarias have encouraged human phase I/IIa vaccination trials aimed at inducing CD8 T cells specific for malaria liver stage antigens. Phase I/IIa trials tested the safety, tolerability and immunogenicity of plasmid DNA, recombinant viruses and synthetic peptides. Table VIII presents a summary of the different human trials.

The human vaccination trials performed so have provided evidence that DNA vaccines can be successfully used to elicit a specific CD8 T cells response (Doolan and Hoffman 2001). In the first study, groups of 5 healthy individuals were immunized with different doses of a plasmid containing the *P. falciparum* CS protein gene produced under Good Manufacturing Practice conditions. Individuals received 3 i.m. doses of plasmid, each consisting of 20 to 2,  $500\mu g$  of DNA. Specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) responses were detected in 2 of 5 individuals immunized with 3 doses of ei-
Plasmid	Base pairs	TS region(s)	CD4 Th1	CD8 Tc1	Protective
	(aminoacids)		immune	immune	immunity
			response	response	
pcDNA3-TS	1-3180(1-1060)	Entire protein	Yes	Yes	Yes
p154/13	1-2034(1-678)	Catalytic domain	Yes	Yes	Yes
p∆154/13	1-825(1-275)	Part of the	Yes	No	No
	catalytic domain				
	(CD4 epitopes)				
pCD8-epitope	1077-1101(359-367)	CD8 epitope	No	No	No
p∆154/13-CD8	1-825+1077-1101	Part of the	Yes	Yes	Yes
	(1-275+359-367)	catalytic domain			
		(CD4 epitopes)			
		and CD8 epitopes			
pcDNA3	None	None	No	No	No

TABLE VII Requirement of DNA coding sequences for CD4 Th1 and CD8 Tc1 epitopes during DNA immunization against experimental *T. cruzi* infection.

Adapted from Fujimura et al. 2001.

#### TABLE VIII

Summary of the Phase I/IIa human vaccination trials carried out to elicit CD8 T-cell-mediated immunity against malaria.

Immunogen	Antigen	Safety and	Responders / Total	Reference
		tolerability	no. of individuals	
			tested (CD8 or CTL)	
Plasmid	P. falciparum	Good	13/14	Wang et al. 2001
	CS protein			
Vaccinia virus	P. falciparum	Good	7/15	Ockenhouse et al. 1998
	CS protein, TRAP, LSA1,			
	MSP1, SERA, AMA1			
	and Pfs25			
Synthetic peptide	P. falciparum	Good	6/8	Lopez et al. 2001
	CS protein			
	(amino acids 282-383)			

ther 20 or  $100\mu g$  of DNA. The higher immunizing doses (500 and 2,  $500\mu g$  of DNA) generated a CTL response in 3 of 5 and 4 of 5 individuals, respectively. MHC-restricted CD8 T-cells mediated CTL activity. CTL responses were significantly higher in individuals who received either 500 or 2,  $500\mu g$  of DNA. However, no difference was observed in the magnitude of the CTL response after 3 doses in individuals immunized with these two doses of DNA. In

general, the CTL responses were stronger in DNAimmunized vaccinees compared to individuals naturally exposed to *P. falciparum* infection (Wang et al. 1998).

A second human trial was designed to test immune responses induced by different routes of immunization. Individuals received three doses of 2.5 mg of DNA i.m. by needle injection or i.m. by needle-less BiojectorTM 2000, or i.m. and i.d. by BiojectorTM 2000 (70% of the total dose i.m. and 30% i.d.). Thirteen of the 14 volunteers had antigen-specific CD8 T cells that produced IFN- $\gamma$  responses against 20-100% of peptides containing defined class I binding epitopes. The data also suggested that Biojector injection i.m. was the most effective route of immunization (Wang et al. 2001).

Current studies are being performed to improve cell-mediated immune responses by the coadministration of a plasmid containing the human GM-CSF gene. Also, individuals are being immunized with several plasmids containing different malarial genes. Results of these new trials are expected to be published soon (reviewed by Doolan and Hoffman 2001).

Phase I/IIa trials have also been performed with NYVAC-Pf7, a highly attenuated vaccinia virus containing 7 *P. falciparum* genes inserted into its genome. The vaccine was considered to be safe and well tolerated. Seven of the 15 individuals that received three doses of 10E8 virus developed a detectable CTL response to at least one of the three liver stage antigens (CS or LSA-1 or TRAP antigen, Ockenhouse et al. 1998). Nevertheless, it is important to notice that the individuals immunized were not HLA matched. Therefore, it is difficult to determine whether the absence of the immune response reflected variable immunogenicity of the vector or lack of CD8 T-cell epitopes.

In a third Phase I/IIa vaccination trial, individuals were immunized with a synthetic peptide representing the C-terminal region of the *P. falciparum* CS protein (amino acids 282-383). Individuals were immunized i.m. with the peptide in the presence of the adjuvants Montanide 720 or Alum. The CD8 T cell immune response was evaluated in HLA-A\*0201 individuals. Upon vaccination, 6 of 8 individuals developed a CD8 T lymphocyte response, as measured by IFN- $\gamma$  secretion. CD8 T cells were mainly directed toward epitopes 327-335 (5 of 8 volunteers) and 299-308 (2 of 8 volunteers, Lopez et al. 2001).

In a very recent publication, a heterologous prime-boost vaccination regime of DNA either in-

tramuscularly or epidermally, followed by intradermal recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA), induced high frequencies of interferon IFN $\gamma$ -secreting, antigen-specific T-cell responses in humans to a pre-erythrocytic malaria antigen, thrombospondin-related adhesion protein (TRAP, McConkey et al. 2003). T-cell responses induced by the DNA vaccine priming-recombinant MVA boosting produced partial protection manifested as delayed parasitemia after sporozoite challenge with *Plasmodium falciparum*.

Taken together, these human vaccination trials open new avenues for new vaccination strategies aimed at inducing malaria-specific CD8 T cells.

# EVASION OF CD8 T-CELL IMMUNE RESPONSE

Viruses are the best known class of pathogens that use a variety of mechanisms to evade the immune recognition by MHC class I restricted CD8 T cells. Some of these strategies may function at the level of the antigen presentation by infected cells such as: i) down regulation of MHC class I expression, ii) interference with cytosolic proteolysis, iii) inhibition of peptide transport to the endoplasmic reticulum (ER), iv) retention and destruction of MHC class I molecules in the ER, v) presence of mutant epitopes that do not bind to MHC I class molecules, etc. Under these circumstances, infected cells have a limited amount of peptide/MHC-class I complexes on their surface that makes them extremely difficult to be recognized by specific CD8 T cells. A detailed review and examples of these evasion mechanisms can be found in Ploegh 1998.

Alternatively, escape mechanisms can interfere with the recognition by MHC I class restricted CD8 T cells. For example, mutant viruses can be selected with amino acid variations that retain binding to MHC class I molecules but result in reduced recognition by T cells or generate antagonistic peptides that inhibit activation of specific T cells by the MHC-peptide complex (reviewed by Ploegh 1998).

Most recently, viral proteins have been described that interfere with the effector mechanisms

Sequence	Isolates of P. falciparum	No. of substitutions	HLA-A*0201 binding	Recognition
			relative activity <sup>a</sup>	(% lysis <sup>b</sup> )
YLNKIQNSL	NF54, 427	0	0.12	100
YL <u><b>K</b>KI<b>K</b>NSI</u>	7G8	3	< 0.03	9
YL <u><b>K</b></u> KIQNSL	WEL, It2G1, T9-101, T4R	1	0.25	83
YL <u>K</u> TIQNSL	LE5	2	0.03	0
YL <u><b>KT</b></u> I <u>K</u> NSL	T9-98, 366a, 399, 406, 419	3	0.10	10
YLQKIQNSL	366b	1	0.20	91
YL <b>Q</b> KI <u>K</u> NSL	406, 419	2	0.30	22
YLN <u>T</u> IQNSL	427	1	0.20	4
YL <b>Q</b> KI <u><b>R</b></u> NSL	366c	2	0.28	14

 TABLE IX

 Polymorphism of a human CD8 T cell epitope restricted by HLA-A\*0201.

Adapted from Bonelo et al. 2000. a = Relative activity in relation to the binding of MA influenza virus peptide. b = Percent maximal lysis induced by a human CD8 T cell clone specific for peptide YLNKIQNSL.

mediated by T cells. For example, poxviruses encode several soluble cytokine receptors that bind to and block the activity of IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  TNF, IL-1 etc. Also, these viruses express a protein termed crmA that functionally inhibits Asp-specific cysteine proteases (caspases), blocking apoptosis induced by CTL, TNF, or Fas (reviewed by Ploegh 1998).

It is unknown whether protozoan parasites have evolved in such a way as to use all these mechanisms of immune evasion. So far very few examples of mechanisms of evasion have been confirmed in the case of the CD8 T cell-mediated immune response to parasites. This lack of information most likely reflects the fact that the CD8 T cell-mediated immune response to parasites only recently has attracted the attention of most investigators.

Amino acid variations in CD8 epitopes within the CS protein of *P. falciparum* malaria parasites have been described. These amino acid substitutions affected binding to HLA I class molecules, generated peptides that failed to stimulate specific CD8 T cells or behaved as antagonistic peptides (Udhayakumar et al. 1997, Gilbert et al. 1998, Bonelo et al. 2000).

The best described example that a variation in a

malaria parasite epitope may interfere with binding to HLA I class molecules or fail to stimulate specific naturally induced human CD8 T cells was described by Bonelo et al. (2000). As shown in Table IX, nine variant peptides based on the sequences of different strains of *P. falciparum* were tested for the ability to bind to HLA-A\*0201 and to be recognized by a human CD8 T cell clone obtained from an individual naturally exposed to the parasite.

Variant peptides from strains 7G8 and LE5 of *P. falciparum* displayed much lower binding affinities for HLA-A\*0201 and were not recognized by the human CD8 T cell clone. Four other variant peptides still retain the ability to bind to HLA-A\*0201. However, because of their amino acid substitutions, they also failed to be recognized by the human CD8 T cell clone. Finally, it is noteworthy that this T cell clone could still recognize fairly well two other variant epitopes represented in several strains of *P. falciparum*. A total of 7 of the 18 different strains could be recognized by a single T cell clone.

This experiment illustrates that there might be naturally occurring variant CD8 epitopes that interfere with recognition of MHC class I restricted T cells. The identification of these variant epitopes may increase our understanding of the importance of certain effector immune mechanisms, and ways in which vaccines can be best designed.

#### PERSPECTIVES

The knowledge that CD8 T cells are essential for efficient immunity to intracellular parasites has raised important questions with basic and applied implications. Several gaps in basic knowledge are expected to be filled in the years to come. Some of the most relevant questions are: i) How are specific CD8 T cells induced and maintained *in vivo*? ii) What are the main effector mechanisms operating *in vivo* against the different parasites? Are there specific or general mechanisms of immune evasion used by each of these parasites? These questions in humans are even more relevant and still more complex to study due to the obvious limitations.

From the applied point of view, it is now clear that the heterologous prime-boost regimes of immunization can be highly efficient in terms of the expansion of protective CD8 T lymphocytes. Nevertheless, the reason why this type of immunization is more efficient than the others is still largely unknown and should be addressed in the future. To our knowledge, few hypotheses have been formulated thus far to explain this event and none was tested experimentally with success.

Finally, human vaccination trials aimed at inducing CD8 T cell-mediated immunity have been initiated and should be further intensified to provide important information about the feasibility of this strategy to develop a new generation of vaccines against parasitic infections.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FAPESP, PADCT, CNPq, PRONEX and FINEP to M.M.R. and I.S.S. M.M.R. and M.I.H are recipients of fellowships from CNPq. S.B.B., J.R.V. and G.S. are recipients of fellowships from FAPESP.

#### RESUMO

Parasitas intracelulares obrigatórios como Plasmodium sp, Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii e Leishmania sp são responsáveis pela infecção de milhões de indivíduos a cada ano. Estes parasitas são capazes de liberar antígenos no citoplasma de células infectadas do hospedeiro que são apresentados por moléculas de MHC classe I para células T CD8 protetoras. As condições de estímulo in vivo destas células T CD8 específicas durante a infecção natural são pouco conhecidas e constituem uma área pouco explorada. Os mecanismos anti-parasitários mediados por células T CD8 incluem vias dependentes e independentes do interferon-y. O fato que células T CD8 são potentes inibidores do desenvolvimento parasitário levou diversos investigadores a explorarem se a indução destes linfócitos T poderia constituir uma estratégia factível para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra estas doenças parasitárias. Estudos feitos em modelos experimentais suportam a hipótese que células T CD8 induzidas por vetores recombinantes virais ou vacinas de DNA podem servir de base para a vacinação humana. Regimes de imunização consistindo de dois vetores distintos (prime-boost heterólogo) são muito mais eficientes em termos da expansão de linfócitos T CD8 protetores do que a imunização com um único vetor. Os resultados obtidos usando modelos experimentais levaram a vacinações clínicas que estão atualmente em curso.

Palavras-chave: CD8, parasitas, imunidade, vacinas.

# REFERENCES

- AIDOO M, LALVANI A, ALLSOPP CE, PLEBANSKI M, MEIS-NER SJ, KRAUSA P, BROWNING M, MORRIS-JONES S, GOTCH F, FIDOCK DA AND AL E. 1995. Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria. Lancet 345: 1003-1007.
- ALIBERTI JC, MACHADO FS, SOUTO JT, CAMPANELLI AP, TEIXEIRA MM, GAZZINELLI RT AND SILVA JS. 1999. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 67: 4819-4826.
- Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, Mothe BR, Steffen S, Boyson JE, Shipley T, Fuller J, Hanke T,

SETTE A, ALTMAN JD, MOSS B, MCMICHAEL AJ AND WATKINS DI. 2000. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. J Immunol 164: 4968-4978.

- ANGUS CW, KLIVINGTON-EVANS D, DUBEY JP AND KovACS JA. 2000. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. J Infect Dis 181: 317-324.
- BELKAID Y, VON STEBUT E, MENDEZ S, LIRA R, CALER E, BERTHOLET S, UDEY MC AND SACKS D. 2002. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major. J Immunol 168: 3992-4000.
- BONELO A, VALMORI D, TRIPONEZ F, TIERCY JM, MEN-THA G, OBERHOLZER J, CHAMPAGNE P, ROMERO JF, ESPOSITO F, NEBIE I, BARBEY C, ROMERO P, HER-RERA S, CORRADIN G AND LOPEZ JA. 2000. Generation and characterization of malaria-specific human CD8(+) lymphocyte clones: effect of natural polymorphism on T cell recognition and endogenous cognate antigen presentationby liver cells. Eur J Immunol 30: 3079-3088.
- BOTTREL RL, DUTRA WO, MARTINS FA, GONTIJO B, CARVALHO E, BARRAL-NETTO M, BARRAL A, AL-MEIDA RP, MAYRINK W, LOCKSLEY R AND GOLLOB KJ. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous *Leishmaniasis*. Infect Immun 69: 3232-3239.
- BRODSKYN CI, BARRAL A, BOAVENTURA V, CARVALHO E AND BARRAL-NETTO M. 1997. Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal *Leishmaniasis*. J Immunol 159: 4467-4473.
- BRUNA-ROMERO O, GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G, HAFALLA JC, TSUJI M AND NUSSENZWEIG RS. 2001. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. Proc Natl Acad Sci USA 98: 11491-11496.
- Carvalho LH, Sano G, Hafalla JC, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. 2002. IL-

4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. Nat Med 8: 166-170.

- COSTA F, FRANCHIN G, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, RIBEIRAO M, SCHENKMAN S AND RODRIGUES MM. 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Vaccine 16: 768-774.
- DE LUCA PM, MAYRINK W, LVES CR, COUTINHO SG, OLIVEIRA MP, BERTHO AL, TOLEDO VP, COSTA CA, GENARO O AND MENDONCA SC. 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary *Leishmaniasis*. Vaccine 17: 1179-1185.
- DENKERS EY AND GAZZINELLI RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev 11: 569-588.
- DENKERS EY, YAP G, SCHARTON-KERSTEN T, CHAREST H, BUTCHER BA, CASPAR P, HEINY S AND SHER A. 1997. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. J Immunol 159: 1903-1908.
- DESOLME B, MEVELEC MN, BUZONI-GATEL D AND BOUT D. 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. Vaccine 18: 2512-2521.
- DOOLAN DL AND HOFFMAN SL. 2001. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation. Int J Parasitol 31: 753-762.
- DOOLAN DL, HOFFMAN SL, SOUTHWOOD S, WENT-WORTH PA, SIDNEY J, CHESNUT RW, KEOGH E, AP-PELLA E, NUTMAN TB, LAL AA, GORDON DM, OLOO A AND SETTE A. 1997. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by multiple HLA-A and HLA-B supertype alleles. Immunity 7: 97-112.
- DOS SANTOS RR, ROSSI MA, LAUS JL, SILVA JS, SAVINO W AND MENGEL J. 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med 175: 29-39.

- FRALISH BH AND TARLETON RL. 2003. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Vaccine 21: 3070-3080.
- FUJIMURA AE, KINOSHITA SS, PEREIRA-CHIOCCOLA VL AND RODRIGUES MM. 2001. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect Immun 69: 5477-5486.
- GARG N AND TARLETON RL. 2002. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 70: 5547-5555.
- GAZZINELLI RT, HAKIM FT, HIENY S, SHEARER GM AND SHER A. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol 146: 286-292.
- GILBERT SC, PLEBANSKI M, GUPTA S, MORRIS J, COX M, AIDOO M, KWIATKOWSKI D, GREENWOOD BM, WHITTLE HC AND HILL AV. 1998. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. Science 279: 1173-1177.
- GONZALEZ JM, PETER K, ESPOSITO F, NEBIE I, TIERCY JM, BONELO A, AREVALO-HERRERA M, VALMORI D, ROMERO P, HERRERA S, CORRADIN G AND LOPEZ JA.
  2000. HLA-A\*0201 restricted CD8+ T-lymphocyte responses to malaria: identification of new *Plasmodium falciparum* epitopes by IFN-gamma ELISPOT. Parasite Immunol 22: 501-514.
- GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G, VAN KAER L, BERGMANN CC, WILSON JM, SCHMIEG J, KRONENBERG M, NAKAYAMA T, TANIGUCHI M, KOEZUKA Y AND TSUJI M. 2002. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. J Exp Med 195: 617-624.
- GURUNATHAN S, SACKS DL, BROWN DR, REINER SL, CHAREST H, GLAICHENHAUS N AND SEDER RA. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. J Exp Med 186: 1137-1147.
- GURUNATHAN S, STOBIE L, PRUSSIN C, SACKS DL, GLAICHENHAUS N, IWASAKI A, FOWELL DJ, LOCK-SLEY RM, CHANG JT, WU CY AND SEDER RA. 2000.

Requirements for the maintenance of Th1 immunity *in vivo* following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. J Immunol 165: 915-924.

- HALONEN SK AND WEISS LM. 2000. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. Infect Immun 68: 3426-3430.
- HANKE T, SAMUEL RV, BLANCHARD TJ, NEUMANN VC, ALLEN TM, BOYSON JE, SHARPE SA, COOK N, SMITH GL, WATKINS DI, CRANAGE MP AND MCMICHAEL AJ. 1999. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. J Virol 73: 7524-7532.
- HIGUCHI MD, RIES MM, AIELLO VD, BENVENUTI LA, GUTIERREZ PS, BELLOTTI G AND PILEGGI F. 1997. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg 56: 485-489.
- HILL AV, ELVIN J, WILLIS AC, AIDOO M, ALLSOPP CE, GOTCH FM, GAO XM, TAKIGUCHI M, GREENWOOD BM, TOWNSEND AR AND AL E. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. Nature 360: 434-439.
- HOFFMAN SL, GOH LM, LUKE TC, SCHNEIDER I, LE TP, DOOLAN DL, SACCI J, DE LA VEGA P, DOWLER M, PAUL C, GORDON DM, STOUTE JA, CHURCH LW, SEDEGAH M, HEPPNER DG, BALLOU WR AND RICHIE TL. 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. J Infect Dis 185: 1155-1164.
- HOLSCHER C, KOHLER G, MULLER U, MOSSMANN H, SCHAUB GA AND BROMBACHER F. 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. Infect Immun 66: 1208-1215.
- HUBER M, TIMMS E, MAK TW, ROLLINGHOFF M AND LOHOFF M. 1998. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8deficient mice. Infect Immun 66: 3968-3970.
- KENT SJ, ZHAO A, BEST SJ, CHANDLER JD, BOYLE DB AND RAMSHAW IA. 1998. Enhanced T-cell immuno-

genicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. J Virol 72: 10180-10188.

- KHAN IA, SMITH KA AND KASPER LH. 1988. Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. J Immunol 141: 3600-3605.
- KHAN IA, SMITH KA AND KASPER LH. 1990. Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. J Clin Invest 85: 1879-1886.
- KHAN IA, ELY KH AND KASPER LH. 1991. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol 147: 3501-3506.
- KHAN IA, ELY KH AND KASPER LH. 1994. Antigenspecific CD8+ T cell clone protects against acute *Tox-oplasma gondii* infection in mice. J Immunol 152: 1856-1860.
- KHAN IA, MATSUURA T AND KASPER LH. 1998. Inducible nitric oxide synthase is not required for longterm vaccine-based immunity against *Toxoplasma gondii*. J Immunol 161: 2994-3000.
- KIMA PE, RUDDLE NH AND MCMAHON-PRATT D. 1997. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous *Leishmania* antigen to CD8+T cells. J Immunol 159: 1828-1834.
- KUMAR A, KUMAR S, LE TP, SOUTHWOOD S, SIDNEY J, COHEN J, SETTE A AND HOFFMAN SL. 2001. HLA-A\*01-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope from the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. Infect Immun 69: 2766-2771.
- KUMAR S AND TARLETON RL. 1998. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol 20: 207-216.
- LI S, RODRIGUES M, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, ES-TEBAN M, PALESE P, NUSSENZWEIG RS AND ZAVALA F. 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5214-5218.

- LOCKSLEY RM, REINER SL, HATAM F, LITTMAN DR AND KILLEEN N. 1993. Helper T cells without CD4: control of *Leishmaniasis* in CD4-deficient mice. Science 261: 1448-1451.
- LOPEZ JA, WEILENMAN C, AUDRAN R, ROGGERO MA, BONELO A, TIERCY JM, SPERTINI F AND CORRADIN G. 2001. A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8(+) and CD4(+) T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies. Eur J Immunol 31: 1989-1998.
- Low HP, SANTOS MA, WIZEL B AND TARLETON RL. 1998. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. J Immunol 160: 1817-1823.
- MALIK A, EGAN JE, HOUGHTEN RA, SADOFF JC AND HOFFMAN SL. 1991. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. Proc Natl Acad Sci USA 88: 3300-3304.
- MCCONKEY SJ, REECE WH, MOORTHY VS, WEBSTER D, DUNACHIE S, BUTCHER G, VUOLA JM, BLAN-CHARD TJ, GOTHARD P, WATKINS K, HANNAN CM, EVERAERE S, BROWN K, KESTER KE, CUMMINGS J, WILLIAMS J, HEPPNER DG, PATHAN A, FLANAGAN K, ARULANANTHAM N, ROBERTS MT, ROY M, SMITH GL, SCHNEIDER J, PETO T, SINDEN RE, GILBERT SC AND HILL AV. 2003. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. Nat Med 9: 729-735.
- MIYAHIRA Y, GARCIA-SASTRE A, RODRIGUEZ D, RO-DRIGUEZ JR, MURATA K, TSUJI M, PALESE P, ESTE-BAN M, ZAVALA F AND NUSSENZWEIG RS. 1998. Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. Proc Natl Acad Sci USA 95: 3954-3959.
- MUNOZ-FERNANDEZ MA, FERNANDEZ MA AND FRESNO M. 1992. Synergism between tumor necrosis factoralpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur J Immunol 22: 301-307.
- MURATA K, GARCIA-SASTRE A, TSUJI M, RODRIGUES M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Nussenzweig RS, Palese P, Esteban M and Zavala F. 1996. Char-

acterization of *in vivo* primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. Cell Immunol 173: 96-107.

- NIELSEN HV, LAUEMOLLER SL, CHRISTIANSEN L, BUUS S, FOMSGAARD A AND PETERSEN E. 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. Infect Immun 67: 6358-6363.
- OCKENHOUSE CF, SUN PF, LANAR DE, WELLDE BT, HALL BT, KESTER K, STOUTE JA, MAGILL A, KRZYCH U, FARLEY L, WIRTZ RA, SADOFF JC, KASLOW DC, KUMAR S, CHURCH LW, CRUTCHER JM, WIZEL B, HOFFMAN S, LALVANI A, HILL AV, TINE JA, GUITO KP, DE TAISNE C, ANDERS R, BAL-LOU WR AND AL E. 1998. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis 177: 1664-1673.
- OLIVEIRA-FERREIRA J, MIYAHIRA Y, LAYTON GT, SAV-AGE N, ESTEBAN M, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, NUSSENZWEIG RS AND ZAVALA F. 2000. Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8(+) T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. Vaccine 18: 1863-1869.
- PARKER SJ, ROBERTS CW AND ALEXANDER J. 1991. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin Exp Immunol 84: 207-212.
- PLEBANSKI M, AIDOO M, WHITTLE HC AND HILL AV. 1997. Precursor frequency analysis of cytotoxic T lymphocytes to pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum* in West Africa. J Immunol 158: 2849-2855.
- PLEBANSKI M, GILBERT SC, SCHNEIDER J, HANNAN CM, LAYTON G, BLANCHARD T, BECKER M, SMITH G, BUTCHER G, SINDEN RE AND HILL AV. 1998. Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. Eur J Immunol 28: 4345-4355.
- PLOEGH HL. 1998. Viral strategies of immune evasion. Science 280: 248-253.
- POMPEU MM, BRODSKYN C, TEIXEIRA MJ, CLARENCIO

J, VAN WEYENBERG J, COELHO IC, CARDOSO SA, BARRAL A AND BARRAL-NETTO M. 2001. Differences in gamma interferon production *in vitro* predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. Infect Immun 69: 7453-7460.

- ROBINSON HL, MONTEFIORI DC, JOHNSON RP, MAN-SON KH, KALISH ML, LIFSON JD, RIZVI TA, LU S, HU SL, MAZZARA GP, PANICALI DL, HERNDON JG, GLICKMAN R, CANDIDO MA, LYDY SL, WYAND MS AND MCCLURE HM. 1999. Neutralizing antibodyindependent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. Nat Med 5: 526-534.
- RODRIGUES EG, ZAVALA F, EICHINGER D, WILSON JM AND TSUJI M. 1997. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. J Immunol 158: 1268-1274.
- RODRIGUES EG, CLAASSEN J, LEE S, WILSON JM, NUSSENZWEIG RS AND TSUJI M. 2000a. Interferongamma-independent CD8+ T cell-mediated protective anti-malaria immunity elicited by recombinant adenovirus. Parasite Immunol 22: 157-160.
- RODRIGUES M, NUSSENZWEIG RS, ROMERO P AND ZAVALA F. 1992. The *in vivo* cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. J Exp Med 175: 895-905.
- RODRIGUES M, LI S, MURATA K, RODRIGUEZ D, RO-DRIGUEZ JR, BACIK I, BENNINK JR, YEWDELL JW, GARCIA-SASTRE A, NUSSENZWEIG RS, ESTEBAN M, PALESE P AND ZAVALA F. 1994. Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. J Immunol 153: 4636-4648.
- RODRIGUES MM, CORDEY AS, ARREAZA G, CORRADIN G, ROMERO P, MARYANSKI JL, NUSSENZWEIG RS AND ZAVALA F. 1991. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. Int Immunol 3: 579-585.
- RODRIGUES MM, RIBEIRAO M, PEREIRA-CHIOCCOLA V, RENIA L AND COSTA F. 1999. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization

of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect Immun 67: 3855-3863.

- RODRIGUES MM, RIBEIRAO M AND BOSCARDIN SB. 2000b. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. Immunol Lett 73: 43-50.
- ROMERO P, MARYANSKI JL, CORRADIN G, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V AND ZAVALA F. 1989. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. Nature 341: 323-326.
- ROTTENBERG ME, BAKHIET M, OLSSON T, KRISTENSSON K, MAK T, WIGZELL H AND ORN A. 1993. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. Infect Immun 61: 5129-5133.
- SCHNEIDER J, GILBERT SC, BLANCHARD TJ, HANKE T, ROBSON KJ, HANNAN CM, BECKER M, SINDEN R, SMITH GL AND HILL AV. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. Nat Med 4: 397-402.
- SCHOFIELD L, VILLAQUIRAN J, FERREIRA A, SCHEL-LEKENS H, NUSSENZWEIG R AND NUSSENZWEIG V. 1987. Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. Nature 330: 664-666.
- SEDEGAH M, JONES TR, KAUR M, HEDSTROM R, HOBART P, TINE JA AND HOFFMAN SL. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7648-7653.
- SEDEGAH M, WEISS W, SACCI JBJ, CHAROENVIT Y, HED-STROM R, GOWDA K, MAJAM VF, TINE J, KUMAR S AND HOBART P HS. 2000. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. J Immunol 164: 5905-5912.
- SEPULVEDA P, HONTEBEYRIE M, LIEGEARD P, MASCILLI A AND NORRIS KA. 2000. DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory

protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 68: 4986-4991.

- SOARES IS AND RODRIGUES MM. 1998. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. Braz J Med Biol Res 31: 317-332.
- SOARES MB, PONTES-DE-CARVALHO L AND RIBEIRO-DOS-SANTOS R. 2001a. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc 73: 547-559.
- SOARES MB, SILVA-MOTA KN, LIMA RS, BELLINTANI MC, PONTES-DE-CARVALHO L AND RIBEIRO-DOS-SANTOS R. 2001b. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. Am J Pathol 159: 703-709.
- STENGER S, ROSAT JP, BLOOM BR, KRENSKY AM AND MODLIN RL. 1999. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. Immunol Today 20: 390-394.
- SUZUKI Y, ORELLANA MA, SCHREIBER RD AND REMING-TON JS. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 240: 516-518.
- TARLETON RL, KOLLER BH, LATOUR A AND POSTAN M. 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulindeficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Nature 356: 338-340.
- TARLETON RL, GRUSBY MJ AND ZHANG L. 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 165: 1520-1525.
- TSUJI M, MIYAHIRA Y, NUSSENZWEIG RS, AGUET M, REICHEL M AND ZAVALA F. 1995. Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor. J Immunol 154: 5338-5344.
- TSUJI M, BERGMANN CC, TAKITA-SONODA Y, MURATA K, RODRIGUES EG, NUSSENZWEIG RS AND ZAVALA F. 1998. Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. J Virol 72: 6907-6910.
- Udhayakumar V, Ongecha JM, Shi YP, Aidoo M, Orago AS, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Hoffman SL, Weiss WR and Lal AA. 1997. Cy-

totoxic T cell reactivity and HLA-B35 binding of the variant *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein CD8+ CTL epitope in naturally exposed Kenyan adults. Eur J Immunol 27: 1952-1957.

- VERCAMMEN M, SCORZA T, HUYGEN K, DE BRAEKELEER J, DIET R, JACOBS D, SAMAN E AND VERSCHUEREN H. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. Infect Immun 68: 38-45.
- WANG R, DOOLAN DL, LE TP, HEDSTROM RC, COONAN KM, CHAROENVIT Y, JONES TR, HOBART P, MARGALITH M, NG J, WEISS WR, SEDEGAH M, DE TAISNE C, NORMAN JA AND HOFFMAN SL. 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. Science 282: 476-480.
- WANG R, EPSTEIN J, BARACEROS FM, GORAK EJ, CHAROENVIT Y, CARUCCI DJ, HEDSTROM RC, RA-HARDJO N, GAY T, HOBART P, STOUT R, JONES TR, RICHIE TL, PARKER SE, DOOLAN DL, NORMAN J AND HOFFMAN SL. 2001. Induction of CD4(+) T celldependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10817-10822.
- WEISS WR, SEDEGAH M, BEAUDOIN RL, MILLER LH AND GOOD MF. 1988. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. Proc Natl Acad Sci USA 85: 573-576.
- WIZEL B, HOUGHTEN RA, PARKER KC, COLIGAN JE, CHURCH P, GORDON DM, BALLOU WR AND HOFF-MAN SL. 1995a. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. J Exp Med 182: 1435-1445.

- WIZEL B, HOUGHTEN R, CHURCH P, TINE JA, LANAR DE, GORDON DM, BALLOU WR, SETTE A AND HOFFMAN SL. 1995b. HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoiteimmunized volunteers. J Immunol 155: 766-775.
- WIZEL B, NUNES M AND TARLETON RL. 1997. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. J Immunol 159: 6120-6130.
- WIZEL B, GARG N AND TARLETON RL. 1998a. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 66: 5073-5081.
- WIZEL B, PALMIERI M, MENDOZA C, ARANA B, SID-NEY J, SETTE A AND TARLETON R. 1998b. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. J Clin Invest 102: 1062-1071.
- YANO A, AOSAI F, YANG TH, HE N, MUN HS, LIU H, INOKO H AND NOROSE K. 1997. Correlation between direct binding ability of synthetic *T. gondii* SAG1 peptides to HLA-A2 measured by a sensor for surface plasmon resonance and antigenicity of the peptides for *T. gondii*-infected cell-specific CTL. Biochem Biophys Res Commun 236: 257-261.
- YAP GS AND SHER A. 1999. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 189: 1083-1092.
- ZAVALA F, RODRIGUES M, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, NUSSENZWEIG RS AND ESTEBAN M. 2001. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of *in vivo* expansion of primed CD8(+) T cells. Virology 280: 155-159.

# A Role for CD103 in the Retention of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> $T_{reg}$ and Control of *Leishmania major* Infection<sup>1</sup>

# Isabelle Suffia,<sup>2</sup>\* Stacie K. Reckling,<sup>2</sup>\* Gerson Salay,\* and Yasmine Belkaid<sup>3</sup>\*

Endogenous regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) play a central role in the control of excessive or misdirected immune responses against self or foreign Ags. To date, virtually no data are available on the nature of the molecules and signals involved in the trafficking and retention of  $T_{reg}$  in tissues where regulation is required. Here, we show that expression of  $\alpha_E\beta_7$  integrin is necessary for the homing of  $T_{reg}$  at site of *Leishmania major* infection. The vast majority of  $T_{reg}$  present in the dermis at steady-state conditions or during *L. major* infection express the  $\alpha_E$  chain (CD103) of  $\alpha_E\beta_7$ . Genetically susceptible BALB/c mice that lack CD103 become resistant to infection, a phenotype that is associated with a poor capacity of  $T_{reg}$  to be retained in the infected site. Such susceptible phenotype can be restored when  $T_{reg}$  from wild-type mice were transferred in CD103<sup>-/-</sup> mice. The central role of CD103 in  $T_{reg}$ retention was further demonstrated by usage of blocking Abs against CD103 and the transfer of  $T_{reg}$  purified from CD103<sup>-/-</sup> mice. Our results strongly suggest that this molecule is induced and maintained on  $T_{reg}$  following or just prior to their arrival in tissues. Furthermore, the expression of CD103 and the subsequent retention of  $T_{reg}$  in tissues is highly regulated by their exposure to *Leishmania* Ag and the level of activation of the APCs they encounter. Thus, CD103, by controlling  $T_{reg}$  retention, can contribute to the outcome of chronic infection by *Leishmania*. *The Journal of Immunology*, 2005, 174: 5444–5455.

aturally occurring CD4 regulatory T cells (T<sub>reg</sub>),<sup>4</sup> the majority of which express CD25, are engaged in dominant control of self-reactive T cells, contributing to the maintenance of immunological self-tolerance (reviewed in Refs. 1 and 2). Recent evidence indicates that their repertoire of Ag specificities is as broad as that of naive T cells enabling them to recognize both self and non-self Ags (1). In particular, we and others have shown that T<sub>reg</sub> play a central role in the control of immune responses against pathogens (3-5). Although T<sub>reg</sub> can modulate both acquired and innate immunity (6), their functions are themselves regulated by the level of activation of the microenvironment they encounter (7, 8). Such control occurs either by direct inhibition of their functions (9) or by overriding their suppressive effect on effector cells. The capacity of  $T_{reg}$  to be selectively retained at sites where regulation is required may also represent an important factor in the control of their local function. Differences in chemokine responsiveness or receptor expression between  $T_{\rm reg}$  and effector T cells have been shown in various models (10-12). However, most data available were obtained using  $T_{reg}$  purified from lymphoid organs in mice or peripheral blood in humans. Virtually

no data are available regarding the signals and molecules that are involved in the trafficking and retention of  $T_{reg}$  at sites of diseases where regulation is required.

Using an intradermal low dose model of Leishmania infection, we have previously shown that T<sub>reg</sub> are essential for the development and maintenance of cutaneous infection with L. major in resistant C57BL/6 mice (13). Treg rapidly accumulate at sites of L. major infection favoring the early parasite expansion. During the acute phase of the infection, which coincides with the expression of effector immune responses, the capacity of Treg to accumulate at site of infection is sharply reduced. After control of the infection, T<sub>reg</sub> accumulate again in the infected tissue, suppress effector T cells, thus enabling the establishment of parasite persistence (13). In this model, the balance between  $T_{reg}$  and effector cells is critical to the expression of immunity. In consequence, such equilibrium has to be tightly controlled. A role for  $T_{reg}$  in the pathogenesis of Leishmania infection is not restricted to the resistant strains. In susceptible BALB/c mice, cells that suppress L. major protective immunity have been shown to belong to an IL-4 and IL-10 producing population of cells with regulatory T cell phenotype that also inhibited colitis (14). In this susceptible strain, the removal of T<sub>reg</sub> transiently exacerbated the Th2 response but eventually led to a better control of the infection (15–18).

In this report, we addressed the mechanisms controlling  $T_{reg}$  retention in *Leishmania*-infected sites. The integrin  $\alpha_E\beta_7$  has been previously shown to be expressed at the surface of 30% of the  $T_{reg}$  in lymphoid tissues (19). Recent data indicated that this integrin also defines a subset of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> with strong suppressive properties and specific migratory patterns (20, 21). The expression of  $\alpha_E$  (CD103) is positively regulated by TGF- $\beta$  (22), a cytokine that is highly expressed at the vicinity of mucosal tissues and at sites of inflammation. The primary ligand of  $\alpha_E\beta_7$  is E-cadherin (23, 24), an epithelial homophilic adhesion molecule, highly expressed at the surface of keratinocytes and Langerhans cells (25). Those results support the idea that CD103 could contribute to  $T_{reg}$  accumulation at the site of *Leishmania* infection.

Division of Molecular Immunology, Cincinnati Children's Hospital Research Foundation, Cincinnati, OH 45229

Received for publication November 16, 2004. Accepted for publication January 30, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health Research Grant R01AI057992-01 (to Y.B.), Cincinnati Children's Hospital Medical Center and the Ellison Medical Foundation. G.S. is supported by the Coodenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> I.S. and S.K.R. contributed equally to this work.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Yasmine Belkaid, at his current address: Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 4 Center Drive, Bethesda, MD 20852. E-mail address: ybelkaid@niaid.nih.gov

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Abbreviations used in this paper:  $T_{reg}$ , regulatory T cell; LN, lymph node; DC, dendritic cell; BMDC, bone marrow-derived DC; M $\phi$ , macrophages; MFI, mean fluorescence intensity.

In this report, we showed that CD103 is necessary for the retention of  $T_{reg}$  at the site of *L. major* infection. We showed that virtually all  $T_{reg}$  found in the dermis were expressing this molecule. BALB/c CD103<sup>-/-</sup> mice became resistant to the infection, a phenotype that correlates with a poor recruitment of  $T_{reg}$  at site of infection. Our results strongly suggest that this molecule is induced and maintained on  $T_{reg}$  following or just prior to their arrival in tissues. Furthermore, we show that the expression of this molecule and the subsequent retention of  $T_{reg}$  in tissues are highly regulated by their exposure to *Leishmania* Ag and the level of activation of the APC they encounter. All together, our results suggest that CD103 plays an important role in the retention of  $T_{reg}$  during the course of the infection.

# **Materials and Methods**

# Mice

C57BL/6, BALB/c, and C.B-17 SCID mice (6–8 wk old) were purchased from Charles River Laboratories. Rag2<sup>-/-</sup> and B6.SJL (Ly5.1) mice were obtained through the Taconic National Institute of Allergy and Infectious Disease (National Institutes of Health) Exchange Program. Fc $\gamma R^{-/-}$  BALB/c mice (26) were kindly provided by Dr. J. Kohl (Children's Hospital, Research Foundation, Cincinnati, OH). CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice (27) were kindly provided by Dr. G. Hadley (University of Maryland Medical School, Baltimore, MD). All mice were maintained in Children's Hospital Research Foundation Animal Facility under pathogen-free conditions.

#### Infection protocol

*L. major* clone V1 (MHOM/IL/80/Friedlin) promastigotes were grown at 28°C in medium 199 supplemented with 20% heat-inactivated FCS (HyClone), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 0.1 mM adenine (in 50 mM HEPES), 5  $\mu$ g/ml hemin (in 50% triethanolamine), and 2  $\mu$ g/ml d-biotin (M199/S). Infective-stage promastigotes (metacyclics) of *L. major* were isolated from stationary cultures using a Ficoll gradient as previously described (28). Mice were infected in the ear dermis with 10<sup>3</sup> or 10<sup>5</sup> *L.major* metacyclic promastigotes using a 27-gauge 1/2 needle in a volume of 10  $\mu$ L.

#### Parasite quantitation

Parasite loads in the ears were determined as previously described (29). Briefly, the ventral and dorsal sheets of the infected ears were separated, deposited dermal side down in RPMI 1640 containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and liberase Cl enzyme blend (0.5 mg/ml; Roche). Ears were incubated for 40 min at 37°C. The sheets were dissociated in RPMI 1640 with 10% serum and 0.05% DNase I (Sigma-Aldrich) using a medimachine (BD Bioscience) according to the manufacturer's protocol. The tissue homogenates were filtered using a 50-µm syringe filter (Falcon Products) and serially diluted in a 96-well flat-bottom microtiter plate containing biphasic medium prepared using 50 µl of NNN medium containing 20% of defibrinated rabbit blood overlaid with 100  $\mu$ l of M199/S. The number of viable parasites in each ear was determined from the highest dilution at which promastigotes could be grown out after 7 days of incubation at 28°C. The number of parasites was also determined in the local draining lymph nodes (LN) (retromaxillar). The LN were mechanically dissociated and parasite load was determined by limiting dilution as described above.

#### Analysis of lymphocytes

Single cell suspensions from the ear dermis and LN were obtained as described above. For the analysis of surface markers and intracytoplasmic cytokines cells were stimulated with *L. major*-infected bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) as a source of Ag for 16 h. The cells were cultured for an additional 6 h with brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) (13) and then fixed in 4% paraformaldehyde. Before staining, cells were incubated with an anti-Fc $\gamma$ III/II receptor and 10% normal mouse serum in PBS containing 0.1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>. Cells were permeabilized and stained for the surface markers CD3 (145-2 C11), TCR- $\beta$  (H57-597), CD4 (RM4-5), CD25 (PC6C1), CD8 (53-6.7), and CD103 (M290) and for the cytokines IFN- $\gamma$  (XNG1.2) and IL-10 (JE56-5H4). Incubations were conducted for 30 min on ice. The isotype controls used were rat IgG2b (A95-1) and rat IgG2a (R35-95). All Abs were purchased from BD Pharmingen. The data were collected and analyzed using CellQuest software and a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). For each sample, at least 100,000 cells

were analyzed. The frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was determined by gating on CD3<sup>+</sup> or TCR- $\beta^+$  cells.

In some experiments,  $CD4^+CD25^+$  and  $CD4^+CD25^-$  T cells from retromaxillar LN of naive or *Leishmania*-infected mice were purified by cell sorting as previously described (30). Purified cells were incubated at a ratio of 5 lymphocytes for 1 BMDC, bone marrow-derived macrophages (M $\phi$ ) (31) or inflammatory M $\phi$  (29) infected or not with *L. major* (ratio of 5 parasites for 1 cell) with or without 100 ng/ml LPS from *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/ml anti-CD40 (1C10; eBioscience) or 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems). At 18 h, cells were collected and surface expression of CD103 on the lymphocyte population was evaluated by flow cytometry.

#### Cytokine assays

For cytokine measurements in culture supernatants, pooled cells from draining LN were resuspended in RPMI 1640 containing FBS/penicillin/ streptomycin at  $6 \times 10^6$  cells/ml, and 200 µl was plated in U-bottom 96-well plates. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with uninfected or *L. major*-infected BMDC or alternatively 50 µg/ml soluble *Leishmania* Ag for 48 h. IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-4 production were analyzed by ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol.

#### Adoptive cell transfers

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were purified from cell sorting as previously described (32). In some cases, CD4<sup>+</sup> T cells were pre-enriched by negative selection using magnetic beads, CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit from Miltenyi Biotec. The T cell subsets were >98% pure as analyzed by flow cytometry. In some experiments, T<sub>reg</sub> were sorted as CD103<sup>-</sup> cells. Purified cell subsets were transferred i.v. into mice (RAG<sup>-/-</sup> or SCID) at the same time as the mice were infected in the ear with *L. major*. For intradermal injection of lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T cells from naive wild-type or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice or 8 wk-infected BALB/c mice were negatively selected using magnetic beads isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Isolated cells were labeled with CFSE (Molecular Probes) before being injected under a volume of 10  $\mu$ l in the dermis in the presence or absence of 5 mg/ml blocking Ab (M290; BD Pharmingen) or isotype control (BD Pharmingen). Both Abs were purchased endotoxin free. After 18 h, dermal cells were collected and labeled for flow cytometry analysis.

#### Suppressive assay

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells isolated from naive or chronically infected wild-type or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice (4 mo infection) were incubated in PBS containing 1.25  $\mu$ M CFSE for 5 min at room temperature. The suppression assay was set up in a 48-well plate in 500  $\mu$ l of complete culture medium per well. CD25<sup>-</sup> T cells and BMDC were seeded at 5 × 10<sup>4</sup> and 7 × 10<sup>4</sup> cells, respectively. CD25<sup>+</sup> T cells (5 × 10<sup>4</sup>) were added or not into the wells where the CD25<sup>-</sup> T cells were activated with 0.5  $\mu$ g/ml soluble anti-CD3 (clone 145-2C11). After a 5-day culture at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and culture supernatant were collected for cytokine ELISA. Cells were collected and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS. Fc receptors were blocked with 24G2 cell line culture supernatant, and cells were stained with anti-CD4 (clone RM4-5) and anti-TCR- $\beta$  chain (clone H57-597) antibodies. Cell acquisition was performed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences). Cell proliferation was quantitated for the CD4<sup>+</sup>TCR- $\beta$ <sup>+</sup> population by analyzing the CFSE fluorescence pattern with ModFit LT software (Verity Software House).

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad). Dual comparisons were made using the unpaired Student's *t* test. All data from parasite numbers were log transformed before statistical tests were conducted.

# Results

# CD103 is highly expressed on $T_{reg}$ at sites of infection

We had previously shown that  $T_{reg}$  accumulates at sites of *Leishmania* infection (13). Based on previous work showing that a subset of  $T_{reg}$  expressed high levels of the integrin  $\alpha_E$  (CD103) (19), we postulated that CD103 (the  $\alpha_E$  chain of the  $\alpha_E\beta_7$  integrin) may contribute to the retention of  $T_{reg}$  at the site of *Leishmania* infection. To address this question we followed the expression of CD103 in the dermis and regional LN during the course of the infection in resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. We

found that the expression of CD103 was differentially expressed between CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells and  $T_{reg}$  in the dermis of C57BL/6 and BALB/c mice (Fig. 1). In both mouse strains, all of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from the dermis at steady-state condition expressed CD103 (Fig. 1A and data not shown). In C57BL/6 mice, during the acute phase (5 wk), at a time in which  $T_{reg}$  stop accumulating in the dermis (13), the proportion of  $T_{reg}$  expressing CD103 decreases from 96% at steady-state condition to 76%. The mean fluorescence intensity (MFI) of CD103 expression by  $T_{reg}$ decreased also significantly in intensity (from an MFI of 540 to 200, Fig. 1*B*) suggesting the presence of  $T_{reg}$  with a wider range of CD103 expression at this stage of the infection. During the chronic phase of the infection, CD103 expression increased (up to 450 at 20-wk postinfection, Fig. 1*B*).

In contrast, only 48% of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells at steady-state condition expressed CD103 and with an intensity that was significantly lower than for  $T_{reg}$  (MFI of 210 vs 540). The percentage of

 $CD4^+CD25^-$  T cells expressing CD103 decreased sharply during the course of the infection to reach 4% at a time when parasite killing occurred (Fig. 1A) and remained low during the persistent phase.

The pattern of expression of this molecule in the regional LN followed the one observed in the infected site (Fig. 1A). Of note, while a small percentage of CD25<sup>-</sup> T cells expressed CD103 at steady-state condition, after infection the expression of this molecule became restricted to the CD25<sup>+</sup> subset (Fig. 1A). The expression of CD103 at the surface of  $T_{reg}$  in regional LN increased during the chronic phase (from 28% to 47%) and kept increasing (in proportion and intensity) with the age of the mice (up to 70% of the  $T_{reg}$  and MFI of 580 at 1 year postinfection, data not shown). In contrast to resistant C57BL/6 mice, in susceptible BALB/c mice infected with a low dose of parasite (10<sup>3</sup>), the number of cells expressing a regulatory T cell phenotype (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>CD45RB<sup>1ow</sup>) increased in a constant manner during the course



of the infection (data not shown). The vast majority of  $T_{reg}$  in the dermis of BALB/c mice expressed CD103 (over 80% at all time points), while <20% of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell expressed this marker (data not shown). The intensity of CD103 expression on the surface of intradermal  $T_{reg}$  was significantly higher than on the surface of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells at steady-state condition and was sustained during the course of the infection (Fig. 1*C*).

We next addressed whether similar patterns of expression were observed for other molecules that had been previously shown to contribute to T cell homing (reviewed in Ref. 33). At different time points postchallenge, both intradermal subsets of CD4<sup>+</sup> lymphocytes,  $T_{reg}$  (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), and effector populations (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) expressed high levels of CD44, CD18 ( $\beta$ 2 chain of LFA-1) and CD11a ( $\alpha_L$  chain of LFA-1) (data not shown). Both subsets expressed CD49d ( $\alpha_4$  chain of VLA-4 and LPAM-1) and CD61 ( $\beta_3$  chain of  $\beta_3 \alpha_v$  and  $\beta_3 \alpha_{iib}$ ) between 20 and 30%. Both subsets were negative for CD62L. Thus, only the expression of CD103 appeared to be restricted to  $T_{reg}$  during the course of the infection.

# CD103<sup>-/-</sup> mice are resistant to infection with L. major

The sustained expression of CD103 in BALB/c mice suggested that an impairment in the expression of this molecule may affect their susceptible phenotype. To determine the functional impact of CD103 ablation on  $T_{reg}$ , we infected wild-type or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice with two doses of *Leishmania*; a high dose of 10<sup>5</sup> parasites that induces a strong Th2 response with an exacerbated susceptibility phenotype (34) and a low dose of 10<sup>3</sup> parasites producing a non-healing phenotype but with a less polarized response and milder lesions (35). Strikingly, the difference between wild-

type and CD103<sup>-/-</sup> mice depended on the inoculum size. At a high dose of parasites, both wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice developed a severe non-healing phenotype (Fig. 2A) with a comparable number of parasites at sites of infection and similar levels of IL-4 and IL-10 production in response to Leishmania Ag (data not shown). At this dose of parasites, no differences were observed in the number and phenotype of intradermal lymphocytes at different time points postinfection (data not shown). In contrast, at a lower dose of infection ( $10^3$ ) CD103<sup>-/-</sup> mice were strongly resistant to infection compared with wild type. The lesion size was significantly reduced at all time points and CD103<sup>-/-</sup> mice resolved their infection after 9 wk of infection. (Fig. 2, A and B). Parasite number was also significantly reduced in the dermis and the draining at 8 wk postinfection (Fig. 2C). Such phenotype correlates with a shift in the nature of the cytokines produced by draining LN cells in response to Leishmania Ag from moderate IFN- $\gamma$  and a high level of IL-4 for wild-type mice and a higher IFN- $\gamma$  production at 4 and 8 wk and no detectable IL-4 for the  $CD103^{-/-}$  mice at 8 and 12 wk postinfection (Table I). After 12 wk of infection, the level of IFN- $\gamma$  was comparable between the two strains whereas IL-10 production was reduced in CD103<sup>-/-</sup> mice (Table I). The number of intradermal CD4<sup>+</sup> lymphocytes releasing IFN- $\gamma$  in response to Leishmania Ag was also enhanced in the dermis of CD103<sup>-/-</sup> mice (16% vs 9% in wild-type mice at 4 wk postinfection, data not shown). CD103<sup>-/-</sup> mice have previously been described to have a reduced number of intradermal lymphocytes at steady-state condition (36). At 4 wk postinfection the number of  $T_{reg}$  was significantly reduced in the dermis of the CD103<sup>-/-</sup> mice whereas only

a trend was observed for the  $CD25^-$  cells (Fig. 3). At 8 wk postinfection, at a time when  $CD103^{-/-}$  mice had efficiently controlled

FIGURE 2. CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice control L. major infection. A, The capacity of CD103<sup>-/-</sup> to control infection is dose dependent. Wild-type (•) or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c (O) mice were injected intradermally with 10<sup>5</sup> (inner graph) and 10<sup>3</sup> L. major promastigotes as indicated. Lesion size was monitored over time. Values represent the mean of lesion size  $\pm$  SD, n = 4. Asterisks represent statistically significant differences between mouse strains (\*, p < 0.01; \*\*, p <0.001). B, Picture of ear lesion from wild-type (left) and CD103<sup>-/-</sup> (right) BALB/c mice at 9 and 14 wk postinfection with 10<sup>3</sup> L. major. C, Parasite number is reduced in CD103<sup>-/-</sup> mice. Mice were injected intradermally with 10<sup>3</sup> L. major promastigotes, and at 4 and 8 wk postchallenge, the number of parasites was evaluated in the dermis and draining LN of wild-type  $(\bullet)$  or CD103<sup>-/-</sup> (O) BALB/c mice. Data represent the absolute number of parasites per organ, four mice per group. Asterisks represent statistically significant differences between wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice (\*\*, p < 0.001; \*\*\*, p < 0.0001; ns, no significant differences).



Table I. Cytokine production by LN cells from wild-type or  $CD103^{-/-}$  BALB/c mice infected with  $10^3$  L. major parasites

	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10
4 wk WT CD103 <sup>-/-</sup>	$130 \pm 21^{a}$ $650 \pm 33^{b}$	$550 \pm 23$ $460 \pm 12$	$123 \pm 12$ $156 \pm 21$
8 wk WT CD103 <sup>-/-</sup>	$860 \pm 41$ $1700 \pm 56^{b}$	$\begin{array}{c} 647 \pm 53 \\ 0 \end{array}$	$382 \pm 32 \\ 374 \pm 44$
12 wk WT CD103 <sup>-/-</sup>	$1830 \pm 63 \\ 1440 \pm 56$	$\begin{array}{c} 1250\pm53\\ 0\end{array}$	$687 \pm 22 \\ 322 \pm 44^{b}$

<sup>*a*</sup> Mean cytokine concentration produced by LN cells  $\pm$  SD (pg/ml) (four mice per group) assayed 48 h after stimulation with 50  $\mu$ g/ml SLA.

<sup>b</sup> Statistically significant (p < 0.01) between wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice.

their parasite load, the number of both populations was dramatically reduced compared with wild-type mice (Fig. 3). A reduction in antigenic load at site of infection can explain that both populations of T cells were reduced at this time point. This reduction of T<sub>reg</sub> cells was restricted to the dermis since the peripheral LN of  $CD103^{-/-}$  mice contained a similar number of  $T_{reg}$  at steady-state conditions and a similar proportion of  $T_{reg}$  were found in the LN during the infection (data not shown). To determine whether the phenotype observed in CD103<sup>-/-</sup> mice could be due to an impairment in the function of  $T_{reg}$ , CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from naive or chronically infected wild-type or CD103<sup>-/-</sup> mice, cells were purified and assessed for their capacity to suppress effector T cells proliferation and cytokine release. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from wild-type and CD103<sup>-/-</sup> naive mice suppressed equally the proliferation as well as both IL-4 and IFN-y release of effector lymphocytes in response to anti-CD3 stimulation (Table II). When CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were purified from mice infected for 3 mo,  $T_{reg}$  from CD103<sup>-/-</sup> mice were still able to suppress effector T cell proliferation and cytokines release whereas CD4+CD25+ T cells from infected wild-type mice suppressed efficiently the release of cytokines by effector cells but poorly suppressed their proliferation (Table II). Thus, T<sub>reg</sub> suppressive function is preserved in CD103<sup>-/-</sup> mice.

To determine whether in this model a reduction of  $T_{reg}$  at site of infection was sufficient to explain the resistant phenotype in CD103<sup>-/-</sup> mice, we directly addressed the role of  $T_{reg}$  in the development of a Th2 response in this model. CD103<sup>-/-</sup> mice were infected in the ear with 10<sup>3</sup> parasites at the same time as  $5 \times 10^5$   $T_{reg}$  from wild-type mice were transferred i.v. At 6 wk postinfection, the lesion size, number of parasites, and cytokine production in response to *Leishmania* Ag were evaluated. The number of parasites and lesion size were significantly increased posttransfer as well as the production of IL-10 and IL-4 by LN cells in response to *Leishmania* Ag compared with non-transferred control (Table III). Thus, transfer of  $T_{reg}$  from CD103<sup>+/+</sup> mice was sufficient to restore a non-healing Th2 phenotype in CD103<sup>-/-</sup> mice.

# CD103 is necessary for the retention of lymphocytes in the dermis at steady-state condition

A previous report showed that the number of intradermal lymphocytes was reduced in  $CD103^{-\prime-}$  mice (36). However, the expression of CD103 is not restricted to  $CD4^+$  T lymphocytes since this molecule can also be expressed on subsets of  $CD8^+$  T cells,  $\gamma\delta$ T cells, dendritic cells (DC), and mast cells (37–44). Thus, impairment in intradermal lymphocytes homing could be the consequence of another cell defect. To directly address the role of CD103 in the retention of intradermal lymphocytes, we purified



**FIGURE 3.** The number of  $T_{reg}$  is reduced in the dermis of *L. major*infected CD103<sup>-/-</sup> mice. Wild-type and CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice were injected intradermally with 10<sup>3</sup> *L. major* promastigotes. At 4 and 8 wk postchallenge, the number of lymphocytes that accumulated at site of infection for wild-type (gray bars) and CD103<sup>-/-</sup> (black bars) mice was evaluated by flow cytometry. Events were gated on TCR- $\beta$ -chain<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD25 positive or negative events as indicated. Histograms represent the mean number of lymphocytes per ear ± SEM, n = 4. Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*, p < 0.001; \*\*\*, p < 0.0001). This experiment is representative of three distinct experiments.

 $CD4^+$  T cells from wild-type or from  $CD103^{-/-}$  naive BALB/c. Cells were labeled with CFSE and inoculated intradermally in BALB/c naive mice. The following day, the number of CFSElabeled CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells retained in the dermis was quantified using flow cytometry analysis (Fig. 4A). The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (but not CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells) retained in the dermis was significantly reduced when CD4+ T cells originated from CD103<sup>-/-</sup> compared with wild-type mice (Fig. 4B). To confirm that such impairment was not due to a developmental defect of T cells in CD103<sup>-/-</sup> mice, we used blocking anti-CD103 Ab in vivo. We used BALB/c mice deficient for the common Fc receptor  $\gamma$  chain to prevent nonspecific binding of the blocking anti-CD103 Abs (IgG2a) through their IgG Fc receptor (26). Negatively selected CD4<sup>+</sup> T cells from retromaxillar LN were CFSE labeled and injected intradermally in the presence of 5  $\mu$ g of anti-CD103 (M290) or isotype control. The following day, the number of lymphocytes that were retained in the injected ear was evaluated. As shown in Fig. 4C, the number of both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells was dramatically reduced when anti-CD103 was injected with CD4<sup>+</sup> T cells compared with isotype control. Similar results were obtained when Treg were obtained from the dermis of BALB/c mice infected for 8 wk (85% reduction of Treg number in the presence of blocking Ab compared with isotype control, data not shown). Interestingly, while CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells constituted only 10% of the original inoculums, after 1 day, approximately 50% of the cells retained were CD25<sup>+</sup> suggesting that, at condition of homeostasis, T<sub>reg</sub> are preferentially retained in the dermis compared with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T

Table II.  $CD4^+CD25^-$  T cell suppression by  $T_{reg}$  from BALB/c wild-type or  $CD103^{-/-a}$ 

			Anti-CD3	
Number of Cell Generations <sup>b</sup>		Anti-CD3	CD25 <sup>+</sup> Naive	CD25 <sup>+</sup> Chronic
Wild-type BALB/c mice				
0	90.0 <sup>b</sup>	3.2	23.5	2.8
1	4.6	1.8	24.2	10.5
2	0.0	8.9	21.5	20.5
3	1.4	26.5	19.9	32.9
4	4.0	59.6	10.9	33.3
IFN- $\gamma$ production <sup>c</sup>	ND	$641 \pm 20$	ND	ND
IL-4 production <sup>a</sup>	ND	$1404 \pm 44$	$44 \pm 35$	ND
CD103 <sup>-/-</sup> BALB/c mice				
0	91.5	0.9	29.9	23.0
1	4.5	2.9	32.5	33.3
2	0.5	3.3	20.5	23.4
3	0.1	26.7	12.2	14.7
4	3.3	66.3	4.9	5.0
IFN- $\gamma$ production	ND	393 ± 16	ND	ND
IL-4 production	ND	$265 \pm 41$	61 ± 11	9 ± 14

 $^{a}$  CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$  T purified from chronically infected wild-type or CD103 $^{-/-}$  mice were seeded at 5  $\times$  10<sup>4</sup> per well in a 48-well plate and activated or not with 0.5  $\mu$ g/ml soluble anti-CD3, in the presence of 7 × 10<sup>4</sup> BMDC. Activated CD25<sup>-</sup> T were co-cultured or not for 5 days with an equal amount of CD25<sup>+</sup> T from naîve (CD25<sup>+</sup> naïve) or chronically infected (CD25<sup>+</sup> chronic) mice (3 mo) of the same genetic background.

Values are expressed as percentages of cells for each number of cell generations.

 $^{c}$  IFN- $\gamma$  and IL-4 amount was quantified by ELISA in culture supernatant after 5 days of activation. Values are mean  $\pm$  SD (pg/ml); ND, not detectable.

cells. One day after intradermal injection, >70% of the CD4<sup>+</sup> T cells retained in the skin were CD103  $^+$  (data not shown).

# $T_{reg}$ from CD103<sup>-/-</sup> mice are impaired in their capacity to be retained at site of infection

Since in CD103<sup>-/-</sup> mice other cells that could contribute to Leishmania susceptibility may be affected, we directly addressed the capacity of CD103<sup>-/-</sup> lymphocytes to migrate into the skin upon infection. Purified CD4+CD25+ T cells from wild-type or CD103<sup>-/-</sup> mice were transferred i.v. into SCID mouse recipients and at the same time the mice were infected intradermally with L. major. At 3 wk postinfection and transfer, the infected tissues were collected. The number of T cells able to accumulate in the dermis was strongly reduced when CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were purified from CD103<sup>-/-</sup> compared with wild-type mice (Fig. 5). In contrast, the engraftment of  $T_{reg}$  from CD103<sup>-/-</sup> was comparable to wild type in regional LN. These data formally demonstrate that in the absence of CD103,  $T_{reg}$  are selectively impaired in their capacity to be retained at site of infection.

# The molecule CD103 is maintained at the surface of $T_{reg}$ following their entrance in the infected site

We next determine whether CD103 was required for  $T_{reg}$  entrance at site of infection. We purified CD4+CD25+ from congenic (Ly5.1<sup>+</sup>) mice as CD103 negative and co-injected them with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells from wild-type background (Ly5.2). Since CD25 can be down-regulated posttransfer, this approach allows us to track cells according to their origin (13). Lymphocytes were co-transferred i.v. into Rag<sup>-/-</sup> mice at the time of L. major infection. At 3 wk postinfection and transfer, the dermal cells were collected and the phenotype of the cells analyzed by flow cytometry. The cells were gated on TCR-β-positive events (Fig. 6, left panel) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> or CD4+CD25<sup>-</sup> events (Fig. 6, middle *panel*) to reproduce the gating strategy that was used in wild-type mice. The vast majority of the cells still expressing CD25 posttransfer originated from regulatory T cells background as indicated by their expression of the congenic marker Ly5.1 (Fig. 6, right panel). Of T<sub>reg</sub> still expressing CD25, 70% had acquired CD103 expression (Fig. 6). Following transfer, 35% of dermal T<sub>reg</sub> lost their expression of CD25. Interestingly, the loss of CD25 expression on those cells also correlated with a poor expression of CD103.

Only 7% of the cells that originated form the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> transferred cells expressed CD103 and with a modest intensity (MFI of 159). Similar results were obtained when before transfer,  $CD4^+CD25^-$  were sorted as  $CD103^{-/-}$  (data not shown). These results suggest that 1) CD103 at the surface of  $T_{reg}$  was defining a subset of  $T_{reg}$  prone to enter the infected site; 2) the expression of CD103 by T<sub>reg</sub> was induced and maintained upon or just prior to arrival in the infected dermis; 3) the vast majority of cells expressing CD103 in the skin originated from transferred T<sub>reg</sub>; and 4) the intensity of CD103 expression correlated with the one of CD25 expression.

Table III. Transfer of  $T_{reg}$  from wild type in CD103<sup>-/-</sup> mice

Cell Transfer <sup>a</sup>	IL- $4^b$	IL-10 <sup>b</sup>	Lesion Size <sup>c</sup>	Parasite Number <sup>d</sup>
None T <sub>reg</sub>	$149 \pm 21$ $482 \pm 96^{e*}$	$331 \pm 43$ $896 \pm 139^{e}**$	$\begin{array}{c} 2.77 \pm 0.82 \\ 6.32 \pm 0.57^{e}{***} \end{array}$	$\begin{array}{c} 5.785 \pm 0.5682 \\ 8.118 \pm 0.3251^{e*} \end{array}$

 $^{a}$  5 × 10<sup>5</sup> T<sub>reg</sub> from wild-type BALB/c mice were transferred intravenously to CD103<sup>-/-</sup> mice at the time of intradermal infection with 10<sup>3</sup> parasites

<sup>b</sup> Mean cytokine concentration produced by LN cells at 6 wk postinfection ± SD (pg/ml) (four mice per group) assayed 48 h after stimulation with 50 µg/ml SLA. <sup>c</sup> Mean lesion size at 6 wk postinfection  $\pm$  SD (mm), four mice per group.

<sup>d</sup> Mean parasite number at 6 wk postinfection expressed in log  $\pm$  SD, four mice per group.

<sup>e</sup> Statistically significant (\*, p < 0.01; \*\*, p < 0.001; and \*\*\*, p < 0.0001) between wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice.





**FIGURE 4.** CD103 is required for the retention of intradermal lymphocytes. *A*, CD4<sup>+</sup> T cells from CD103<sup>-/-</sup> mice are impaired in their capacity to be retained in the dermis. Negatively selected CD4<sup>+</sup> T cells from LN of naive wild-type or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice were labeled with CFSE before being injected in the dermis (5 × 10<sup>5</sup> cells per ear). At 18 h postinjection, dermal cells were recovered and immunolabeled for flow cytometry analysis. Histograms represent events gated on TCR- $\beta$ -chain<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD25 positive or negative events as indicated. Numbers represent the mean percentage of cells retained in the dermis relative to the total number of cells extracted from the ear; *n* = 4, each mice was analyzed individually. This experiment is representative of three distinct experiments. *B*, Absolute number of cells per ear of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> from wild-type (gray bars) or CD103<sup>-/-</sup> (black bars) retained in the dermis. Values represent the mean of absolute number of TCR- $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>-</sup>) CFSE<sup>+</sup> cells per ear  $\pm$  SD, *n* = 4; asterisks represent statistically significant difference between the number of lymphocytes from wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice (\*\*, *p* < 0.001); ns, no significant differences. This experiment is representative of three distinct experiments. *C*, Blocking Ab against CD103 prevents CD4<sup>+</sup> T cell retention. CD4<sup>+</sup> T cells from LN of naive wild-type BALB/c mice were labeled with CFSE before being inoculated in the dermis of Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> mice in the presence of 5  $\mu$ g total of isotype control (gray bars) or anti-CD103 (M290) (black bars). The following day, dermal cells were recovered and immunoassayed for flow cytometry analysis. Values represent the mean of absolute number of lymphocytes retained in the dermis in the presence of spitice at the mean of absolute number of lymphocytes retained in the dermis of Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> mice in the presence of 5  $\mu$ g total of isotype control (gray bars) or anti-CD103 (M290) (black bars). The following day, dermal cells

# The surface expression of CD103 on $T_{reg}$ is highly regulated

Since the expression of CD103 decreased during the course of the infection in resistant C57BL/6 mice (Fig. 1), we determined whether the exposure of  $T_{reg}$  to a pro-inflammatory or a deactivating environment could modulate the expression of this molecule. We purified  $T_{reg}$  from the LN of chronically infected mice and exposed them to BMDC or M $\phi$  infected or not with *Leishmania*. Interestingly, when  $T_{reg}$  purified from chronically infected mice were exposed to *Leishmania*-infected DC, the expression of CD103 was increased in percentage (from 43 to 71%, Fig. 7A) and intensity (from an MFI of 55 to 86) (Fig. 7B). On the other hand, when  $T_{reg}$  were exposed to BMDC in the presence of LPS, the level of expression of CD103 was significantly decreased from an MFI of 86 to 10 (Fig. 7B). Likewise, CD103 expression at the surface of  $T_{reg}$  was down-regulated following exposure to DC that were activated with anti-CD40 agonist Ab (clone 1C10, data not

shown). TGF-β can enhance CD103 expression on T cells (22). Consistently, if  $T_{reg}$  were exposed to infected BMDC in the presence of TGF-β, the expression of CD103 was enhanced in proportion (from 71 to 92%, data not shown) and intensity (from 95 to 140, data not shown). Since previous report showed that  $T_{reg}$  can express TLRs and in particular TLR-4 (45), we tested the direct role of LPS on CD103 expression by  $T_{reg}$ . A direct exposure of  $T_{reg}$  to LPS failed to induce down-regulation of CD103 (Fig. 7*B*) demonstrating that such effect was mediated by activated DC and not through direct interaction of LPS with  $T_{reg}$ . Inflammatory Mφ or Mφ derived from bone marrow were unable to either enhance or down-regulate CD103 expression under those various conditions (data not shown).

To determine whether the level of expression of CD103 could also be down-regulated in vivo, we injected LPS intradermally and followed the expression of CD103 at the surface of the recruited



**FIGURE 5.**  $T_{reg}$  from CD103<sup>-/-</sup> mice are impaired in their capacity to migrate at site of *L. major* infection.  $T_{reg}$  were purified from the LN of naive wild-type or CD103<sup>-/-</sup> BALB/c mice;  $3 \times 10^5$  cells were transferred into SCID recipient mice at the time of infection in the ear with *L. major*. At 3 wk postinfection, dermal cells were collected and lymphocyte numbers in the infected site (*A*) and regional LN (*B*) were evaluated by flow cytometry. Values represent the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>TCR- $\beta$ -chain<sup>+</sup> cells per ear or LN at 3 wk postchallenge for wild-type ( $\bullet$ ) and CD103<sup>-/-</sup> ( $\bigcirc$ ) T cell transfers, four mice per group. \*\*, statistically significant differences (p < 0.001) between wild-type and CD103<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell transfers; n.s., nonsignificant differences. This data is representative of four distinct experiments.

lymphocytes. The injection of PBS alone mobilized a small number of CD4<sup>+</sup> T cells (2-fold increase compared with non-injected control, data not shown). The vast majority (72%) of the CD4<sup>+</sup> T cells in the dermis were both CD103 and CD25 positive (Fig. 7*C*, *bottom panel*). The injection of 100 ng of LPS induced the recruitment of a large number of CD4<sup>+</sup>T cells (12-time increase compared with PBS, data not shown) that were essentially CD103<sup>-</sup> and CD25<sup>-</sup>. Interestingly, the intensity of CD103 expression at the surface of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was also reduced (MFI of 144 compared with 302 with PBS) (Fig. 7*C*, *bottom panel*). Thus, the injection of a high dose of LPS favored the recruitment of CD4<sup>+</sup> T cells that did not express CD103 and/or strongly down-regulated the expression of this marker. When 100 ng of LPS was injected into CD103<sup>-/-</sup> mice, the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> T cells recruited in the dermis was comparable to wild-type mice.

# Discussion

In this report, we showed that the  $\alpha_{\rm E}$  chain (CD103) of the  $\alpha_{\rm E}\beta_7$ integrin plays a critical role in the retention of T<sub>reg</sub> at the site of Leishmania infection. We and others have shown previously that the outcome of chronic infection by L. major was tightly controlled by the equilibrium between  $T_{reg}$  and effector T cells (13, 16, 17, 30). Here we report that CD103 can contribute to the local control of this equilibrium. Genetically susceptible mice that lack CD103 became resistant to the infection, a phenotype that was associated with an impairment of T<sub>reg</sub> to accumulate at sites of infection. Our results demonstrate that CD103 is not necessary for the entrance of T<sub>reg</sub> in tissues but induced upon or just prior to their arrival in the infected dermis and required for Treg retention. The expression of CD103 is highly regulated by the environment, with pro-inflammatory signals inducing its down-regulation. This report is, to our knowledge, the first direct demonstration that a molecule can selectively contribute to T<sub>reg</sub> homing at sites of infection.

The CD103 molecule is the  $\alpha_{\rm E}$  chain of the  $\alpha_{\rm E}\beta_7$  integrin whose principal ligand is E-cadherin, an epithelial homophilic adhesion molecule. Expression of CD103 at very high levels is a hallmark of intraepithelial lymphocytes residing in the gut wall and other epithelial compartments such as the skin and lung (46). This molecule is also expressed at high levels by subsets of mucosal mast cells, mucosal DC, and a subset of DC from lymphoid organs (37-44). The first suggestion that CD103 could be involved in T cell homing came from the observation that in CD103 deficient mice, the number of T cells was reduced in the skin and intestinal epithelia (36). Previous studies indicate that CD103 expression also characterizes a subset of peripheral CD8<sup>+</sup> T cells with a unique capacity to access the epithelial compartment of organ allograft (27, 47). Recently, it has been shown that CD103 was also expressed at the surface of natural CD4+CD25+ T cells from lymphoid organs, 30% of which express this molecule (19). T<sub>reg</sub> expressing CD103 efficiently prevent the development of colitis in the SCID model, although those cells display rather poor suppressive capacity in vitro (20). This molecule also allows to define subsets of regulatory T cells (CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>-</sup>) present in lymphoid organs with a distinct profile of adhesion molecules (21). Those subsets, following activation in vitro, were able to migrate



**FIGURE 6.** The expression of CD103 is induced on  $T_{reg}$  upon arrival at site of infection.  $T_{reg}$  from congenic B6.SJL mice (Ly5.1) were purified by cell sorting as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> cells and co-injected with purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from C57BL/6 mice (Ly5.2);  $2 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> and  $6 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells were injected i.v. into RAG<sup>-/-</sup> recipient at the time of intradermal injection of 10<sup>3</sup> *L. major*. At 3 wk posttransfer and infection, dermal cells were collected and analyzed by flow cytometry. Events were gated on TCR- $\beta$ , CD4 positive events (*left*) and subsequently on CD25 positive or negative events as indicated (*right*); numbers within quadrants represent MFI of CD103 expression for the events of the designated quadrant; numbers on the right represent percentages of cells in each quadrant. Four mice were injected per group and analyzed individually, and this data is representative of three separate experiments.



**FIGURE 7.** Inflammatory signals down-regulate CD103 expression at the surface of  $T_{reg}$ . A, Activation level of DC modulates CD103 expression.  $T_{reg}$  were purified from the LN of chronically infected mice and incubated with BMDC (DC) or *L. major*-infected BMDC (DCI) in the presence or absence of 100 ng/ml LPS. After 18 h, cells were collected and CD103 was evaluated by flow cytometry analysis. Histograms represent the expression of CD103 at the surface of  $T_{reg}$ . Events were gated on TCR- $\beta$  and CD4 positive events. Positive events were determined compared with isotype control (lines). Each condition was done in triplicate. *B*,  $T_{reg}$  were purified from LN of chronically infected mice and incubated for 1 day with *L. major*-infected or non-infected DC in the presence or absence of LPS (100 ng/ml). The values are expressed as the  $\Delta$ MFI between anti-CD103 staining and isotype control  $\pm$  SD, n = 3. This data is representative of three distinct experiments. Asterisks represent statistically significant differences between indicated groups (\*\*, p < 0.001; \*\*\*, p < 0.0001). *C*, CD4<sup>+</sup> T cells mobilized by LPS injection are CD103 low or negative. C57BL/6 mice were injected intradermally with PBS, or 100 ng of LPS. At 18 h postinjection, dermal cells were extracted, and the phenotype of the collected cells was analyzed by flow cytometry. Events were gated on TCR- $\beta^+$  cD4<sup>+</sup> cD25<sup>+</sup>-gated events (*top panel*) and TCR- $\beta^+$ CD4<sup>+</sup> events (*bottom panel*). The numbers (*top panel*) represent the percentage of CD4<sup>+</sup> positive events that were positive for CD103; the underlined numbers (*bottom panel*) represent the MFI of CD103 expression on TCR- $\beta^+$ CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-gated events. Four mice were injected per group; these data are representative of two distinct experiments.

to sites of inflammation and control the intensity of the local response (21). Thus, those studies demonstrated that CD103 allows identification of subsets of regulatory T cells, but a direct role for the CD103 molecule in  $T_{reg}$  retention remained to be addressed.

Our results demonstrate that CD103 is required for  $T_{reg}$  retention at steady-state condition and during *Leishmania* infection. At steady-state conditions, we have shown that half of the lymphocytes homing in the dermis express a regulatory phenotype with a high level of CD25, glucocorticoid-induced TNF receptor, and CTLA-4 expression (13). The skin is a highly exposed organ that requires multiple levels of regulation in which regulatory T cell accumulation may be instrumental. In this study, we showed that the vast majority of dermal  $T_{reg}$  also expressed high levels of CD103 and that this molecule was required for the homing of  $T_{reg}$  in the dermis. Blockade with anti-CD103 Ab prevents  $T_{reg}$  retention in the dermis, and  $T_{reg}$  purified from CD103<sup>-/-</sup> are directly impaired in their capacity to accumulate or be retained in the dermis of naive mice.

Our results strongly suggest that CD103 is also required for the homing of  $T_{reg}$  during the course of infection with *Leishmania*. We have previously shown that in genetically resistant mice,  $T_{reg}$  are preferentially attracted to sites of *L. major* infection during parasite expansion and following clinical cure (30). Such retention correlates with a strong expression of CD103 at the surface of  $T_{reg}$ . Genetically susceptible mice that lack CD103 are resistant to *L. major* infection, a phenotype that is associated with a poor capacity of  $T_{reg}$  to accumulate in the infected skin. Although we cannot exclude that other parameters may contribute to the resistant phe-

notype observed in CD103<sup>-/-</sup> mice, a direct role for CD103 in  $T_{reg}$  retention is supported by the fact that  $T_{reg}$  from CD103<sup>-/-</sup> transferred into SCID mice are directly impaired in their capacity to accumulate at the site of *Leishmania* infection.

Previous reports supported a role for  $T_{reg}$  in the establishment of the susceptible phenotype in BALB/c mice. For instance, the CD4<sup>+</sup> T cells that suppress L. major immunity in BALB/c have been shown to belong to an IL-4 and IL-10 producing population of cells CD45RB<sup>low</sup> that also inhibited colitis (14). In addition, the biweekly administration of anti-CD25 during the first 4 wk of infection renders BALB/c mice resistant to L. major infection (15). More recently, it was shown that in BALB/c mice, the removal of Treg initially enhanced Th2 phenotype but eventually led to a better control of the infection (16-18). In our low dose infection model, the reduction of T<sub>reg</sub> in the infected dermis (and not the regional LN) of CD103<sup>-/-</sup> mice was associated with a shift toward a selfcontrolled Th1 phenotype. A possible explanation for the role that T<sub>reg</sub> play in this polarization would be that, in susceptible mice, T<sub>reg</sub> at the site of infection by maintaining a deactivating environment, modulate the innate response in a way that favors a Th2 polarization. A direct confirmation that Treg favor Th2 responses in our model came from the fact that the transfer of T<sub>reg</sub> from wildtype mice was sufficient to restore a Th2-susceptible phenotype in CD103<sup>-/-</sup> mice. This result is in accordance with recently published observations showing that during Schistosoma mansoni infection, Treg suppress Th1 responses allowing for the development of a protective Th2 response (48). Interestingly, despite a reduction

of  $T_{reg}$  at sites of infection, no substantial difference in IL-10 production by LN cells was detectable between the wild-type and CD103<sup>-/-</sup> mice until 12 wk postinfection. Since  $T_{reg}$  are a major source of IL-10 in various parasitic model (13, 48, 49), this finding is in apparent contradiction with a reduced role for  $T_{reg}$  in CD103<sup>-/-</sup> mice during *Leishmania* infection. On the other hand, in BALB/c mice infected with *Leishmania* other populations of T cell have been shown to produce IL-10 (50). In addition,  $T_{reg}$  from LN of CD103<sup>-/-</sup> mice display strong suppressive function in vitro as assessed by their capacity to inhibit proliferation and cytokine production by effector T cells. Thus, although the number of  $T_{reg}$  is greatly reduced in the dermis of infected CD103<sup>-/-</sup> mice, the number and function of  $T_{reg}$  in regional LN is not affected.

Several types of regulatory cells exist some of which are induced in response to infectious challenge (e.g., Tr1 or  $T_H3$ ) and some of which are judged as natural regulators (51). In our present study, we have primarily addressed the role of natural  $T_{reg}$ ; however, during chronic infections in BALB/c mice, we cannot exclude that both natural and inducible  $T_{reg}$  contribute to the susceptible phenotype. For instance, natural  $T_{reg}$  are more likely to contribute to the early events occurring during infection whereas both subsets could control later stage of the infection. Indeed,  $T_{reg}$  extracted from LN of chronically infected mice were less able to suppress effector cells than naive natural  $T_{reg}$ , suggesting that other populations were present in the CD25<sup>+</sup> fraction. Nevertheless, our results suggest that regardless of their origin,  $T_{reg}$  are not retained in the absence of CD103.

The requirement for CD103 expression does not apply to effector T cells or to T<sub>reg</sub> when high inflammatory conditions are present. When LPS was injected intradermally, the population of T cells mobilized in the dermis was CD103 negative. Likewise, the effector T cell population mobilized in Leishmania-infected dermis did not express this molecule. In addition, both populations of lymphocytes can be efficiently recruited in the dermis of CD103<sup>-/-</sup> mice following inflammatory stimuli (LPS) or when the mice were infected with a high dose of parasites. Thus, a role for CD103 appears to be mostly restricted to  $T_{reg}$  when homeostasis must be restored. We cannot exclude that a fraction of conventional CD4<sup>+</sup> T cells also require CD103 for their retention. Indeed, half of the CD25<sup>-</sup> cells at steady-state condition (but not during infection) expressed this marker but with lesser intensity than T<sub>res</sub>. In addition, use of anti-CD103-blocking Abs also reduced the number of CD25<sup>-</sup> cells that were retained in the dermis. To determine whether those cells are derived from regulatory T cells or conventional CD4<sup>+</sup> T cells remains to be addressed.

A role for CD103 in the retention of  $T_{reg}$  is supported by previous observations (21). In a model of inflammatory skin disorder, mice reconstituted with CD4<sup>+</sup> T cells from CD103<sup>-/-</sup> mice develop more severe lesions compared with mice reconstituted with CD4<sup>+</sup> T cells from wild-type mice (52). In addition, CD103<sup>-/-</sup> mice tend to develop spontaneous skin disorders (52). In humans, the expression of  $\alpha_E\beta_7$  is also associated with some clinical cutaneous disorders such as T cell lymphoma, lichen planus, or atopic dermatitis (40, 53–55). All together, these results suggest that a dysregulation of CD103 expression correlates with a disruption of the local immunoregulation of the skin leading to excessive pathological responses. Thus, by controlling T<sub>reg</sub> tropism, CD103 could contribute to the control of peripheral homeostasis and the pathological process due to microbial infection.

Our results suggest that CD103 does not define a subset of regulatory T cells with distinct properties but rather that this molecule is rapidly induced and maintained on  $T_{reg}$  following or just prior to their arrival in tissues. Using transfer experiments, we showed that  $T_{reg}$  purified as CD103 negative can enter efficiently at the site of infection and express this marker. In addition, our results demonstrate that the only cells able to express high levels of CD103 originated from the natural Treg population. The acquisition of this marker following or just prior to migration in tissues is also observed for CD8<sup>+</sup> T cells that respond to donor alloantigens in the graft site (47). Interestingly, the loss of CD25 expression that is observed on T<sub>reg</sub> upon homeostatic proliferation (13) is also associated in our study with a reduction in CD103 expression in Leishmania-infected sites. Nevertheless, a small proportion of transferred T<sub>reg</sub> that became CD25<sup>-</sup> still expressed CD103. Previous results published by Huehn et al. (21) suggest that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup> cell subsets isolated from lymphoid organs have undergone repetitive cell divisions. Consistent with this hypothesis, aging mice have an increased number of cells expressing CD103 with functional suppressive function (56). Thus, this subset may have originated from  $CD25^+CD103^+$  T<sub>reg</sub> cells that have undergone massive proliferation. All together these results suggest that CD103 may be a better predictor of the natural  $T_{reg}$  origin than CD25 and could allow purification of T<sub>reg</sub> that have been previously exposed to Ag in the periphery. Such an approach may be particularly useful in human studies in which peripheral blood is the most accessible compartment.

Although T<sub>reg</sub> control the intensity of effector immune responses, their functions also have to be controlled. Such control occurs either by direct inhibition of their function or by overriding their suppressive effects on effector cells (2). Although the homing property of T<sub>reg</sub> remains poorly defined, their capacity to be selectively retained at sites where regulation is required may represent an important factor in the control of peripheral homeostasis. We had previously shown that both effector T cells and T<sub>reg</sub> could enter at primary and secondary sites of infection with similar efficiency (30) suggesting that the regulation of T<sub>reg</sub> accumulation is not at the level of recruitment but more likely at the level of differential retention. In this report, our results suggest that the encounter with the microenvironment and the subsequent regulation of CD103 will dictate the capacity of  $T_{reg}$  to be retained. Previous reports demonstrated that the  $\alpha_{\rm E}$  subunit of the integrin  $\alpha_{\rm E}\beta_7$  is transcriptionally regulated by TGF- $\beta$  (22). Supporting this observation, in susceptible BALB/c mice (in which high levels of TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-10 are produced (57, 58)), T<sub>reg</sub> maintained a high level of expression of CD103 during the course of the infection. Thus, a deactivating environment that dominates in the context of an early infection, a chronic infection, or a highly susceptible phenotype will favor CD103 expression at the surface of T<sub>reg</sub>. In vitro, exposure of  $T_{reg}$  purified from chronically infected mice to L. major-infected DC led to an increase of CD103 expression suggesting that the parasite itself manipulates its environment to favor  $T_{reg}$  retention. It is therefore tempting to speculate that  $T_{reg}$ expressing CD103 found in lymphoid organs is enriched in  $T_{reg}$ that are specific for Ags that are presented in tissues enriched in deactivating cytokines such as the gut, the lung, or the skin. In contrast, when T<sub>reg</sub> were exposed to infected DC in the presence of proinflammatory stimuli (e.g., LPS, anti-CD40), CD103 expression was sharply down-regulated. Our results in vivo mirror those observations; CD103 expression at the surface of T<sub>reg</sub> is downregulated in resistant C57BL/6 mice during the acute phase of the infection. During this phase, a proportion of T<sub>reg</sub> in the dermis are negative for CD103, and the overall intensity of fluorescence decreased compared with steady-state conditions, which suggests the presence of T<sub>reg</sub> with a wider expression of CD103. During this phase, parasite invades DC, an event that induces DC activation (59). In contrast with lymphoid cells, when T<sub>reg</sub> were purified from the infected dermis, the expression of CD103 could not be further modulated in vitro. Thus, those results suggest that during the

acute phase of the infection,  $T_{reg}$  that are patrolling through the infected site would not encounter conditions that favor the expression of this marker. Similarly,  $T_{reg}$  that were elicited by the intradermal injection of high levels of LPS had a reduced expression of CD103. Thus, our results suggest that the expression of CD103 and the subsequent retention of  $T_{reg}$  in tissues are highly regulated by the level of activation of the microenvironment they encounter.

Integrin-mediated cell adhesion with the extracelluar matrix and neighboring cells can profoundly influence a variety of signaling events including those involved in mitogenesis, survival, and differentiation (reviewed in Ref. 60). For instance, the role of CD103 as a costimulatory molecule has been previously shown for thymocytes (61). E-cadherin, the ligand of  $\alpha_{\rm E}\beta_7$ , is highly expressed at the surface of keratinocytes and Langerhans cells in the skin, site of *L. major* infection. Understanding the functional consequences of the interaction between  $\alpha_{\rm E}\beta_7$  and its natural ligand on  $T_{\rm reg}$  function and survival remains to be addressed.

In this report, we propose that the regulation of  $T_{reg}$  accumulation at sites of infection is not dictated by their capacity to enter but more likely by the capacity of  $T_{reg}$  to be selectively retained or alternatively to better survive/proliferate locally. Creating a microenvironment that favors  $T_{reg}$  retention may represent a fundamental strategy to favor microbial survival. Thus, *Leishmania*, like other pathogens known to produce chronic infection, triggers the production of deactivated cytokine (TGF- $\beta$ , IL-10) by the cells they infect.  $T_{reg}$  patrolling through tissues could encounter Ag in a context that will or will not favor their local retention providing for an additional level of control of  $T_{reg}$  function. All together, our results suggest that the integrin  $\alpha_E \beta_7$  could be used as a therapeutic target to manipulate the expression of local immunity.

#### Acknowledgments

We thank Dan Marmer and Sue Vergamini (Cincinnati Children's Hospital Research Foundation) from the flow cytometry unit for cell sorting, Dr. Keller (Cincinnati Children's Hospital Research Foundation) for help with the mouse care, and Drs. Matthias Hesse, Claire Chougnet and Joerg Kohl for critical reading of the manuscript.

#### **Disclosures**

The authors have no financial conflict of interest.

#### References

- Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.* 16:81.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531.
- Maloy, K. J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2:816.
- Asseman, C., and M. von Herrath. 2002. About CD4<sup>pos</sup>CD25<sup>pos</sup> regulatory cells. Autoimmunity Rev. 1:190.
- Shevach, E. M. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389.
- Maloy, K. J., L. Salaun, R. Cahill, G. Dougan, N. J. Saunders, and F. Powrie. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197:111.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells [comment]. *Science* 299:1033.
- Choi, B. K., J. S. Bae, E. M. Choi, W. J. Kang, S. Sakaguchi, D. S. Vinay, and B. S. Kwon. 2004. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J. Leukocyte Biol.* 75:785.
- Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, and P. Santamaria. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 19:877.
- Bystry, R. S., V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2001. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.* 2:1126.
- Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. J. Exp. Med. 194:847.

- Szanya, V., J. Ermann, C. Taylor, C. Holness, and C. G. Fathman. 2002. The subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol.* 169:2461.
- Belkaid, Y., A. C. Piccirilo, S. Mendez, E. Shevack, and D. L. Sacks. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502.
- Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 179:589.
- Heinzel, F. P., R. M. Rerko, F. Hatam, and R. M. Locksley. 1993. IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. J. Immunol. 150:3924.
- Xu, D., H. Liu, M. Komai-Koma, C. Campbell, C. McSharry, J. Alexander, F. Y. Liew. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J. Immunol.* 170:394.
- Aseffa, A., A. Gumy, P. Launois, H. R. MacDonald, J. A. Louis, and F. Tacchini-Cottier. 2002. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 169:3232.
- Liu, H., B. Hu, D. Xu, and F. Y. Liew. 2003. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-β, and CTLA4. *J. Immunol.* 171:5012.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor [comment]. *Immunity 16:311.*
- Banz, A., A. Peixoto, C. Pontoux, C. Cordier, B. Rocha, and M. Papiernik. 2003. A unique subpopulation of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur. J. Immunol.* 33:2419.
- Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, et al. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 199:303.
- 22. Robinson, P. W., S. J. Green, C. Carter, J. Coadwell, and P. J. Kilshaw. 2001. Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin  $\alpha_{\rm E}\beta_7$ (CD103). *Immunology 103:146*.
- Dietz, S. B., D. Whitaker-Menezes, and S. R. Lessin. 1996. The role of α<sub>E</sub>β<sub>7</sub> integrin (CD103) and E-cadherin in epidermotropism in cutaneous T-cell lymphoma. J. Cutan. Pathol. 23:312.
- Agace, W. W., J. M. Higgins, B. Sadasivan, M. B. Brenner, and C. M. Parker. 2000. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin α<sub>E</sub>(CD103)β<sub>7</sub>, LEEP-CAM and chemokines. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:563.
- Jakob, T., A. Saitoh, and M. C. Udey. 1997. E-cadherin-mediated adhesion involving Langerhans cell-like dendritic cells expanded from murine fetal skin. *J. Immunol.* 159:2693.
- Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J. V. Ravetch. 1994. FcRγ chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* 76:519.
- Feng, Y., D. Wang, R. Yuan, C. M. Parker, D. L. Farber, and G. A. Hadley. 2002. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 196:877.
- Spath, G. F., and S. M. Beverley. 2001. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.* 99:97.
- Belkaid, Y., B. Butcher, and D. L. Sacks. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur. J. Immunol.* 28:1389.
- Mendez, S., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, D. Sacks, and Y. Belkaid. 2004. Role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J. Exp. Med.* 200:201.
- Antoine, J. C., E. Prina, C. Jouanne, and P. Bongrand. 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* 58:779.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J. Exp. Med. 188:287.
- Pribila, J. T., A. C. Quale, K. L. Mueller, and Y. Shimizu. 2004. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22:157.
- Locksley, R. M., and J. A. Louis. 1992. Immunology of leishmaniasis. Curr. Opin. Immunol. 4:413.
- 35. Bretscher, P. A., O. Ogunremi, and J. N. Menon. 1997. Distinct immunological states in murine cutaneous leishmaniasis by immunising with different amounts of antigen: the generation of beneficial, potentially harmful, harmful and potentially extremely harmful states. *Behring Inst. Mitt.* 98:153.
- 36. Schon, M. P., A. Arya, E. A. Murphy, C. M. Adams, U. G. Strauch, W. W. Agace, J. Marsal, J. P. Donohue, H. Her, D. R. Beier, et al. 1999. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin α<sub>E</sub> (CD103)-deficient mice. J. Immunol. 162:6641.
- Kilshaw, P. J. 1993. Expression of the mucosal T cell integrin αM290β<sub>7</sub> by a major subpopulation of dendritic cells in mice. *Eur. J. Immunol.* 23:3365.
- 38. Karecla, P. I., S. J. Bowden, S. J. Green, and P. J. Kilshaw. 1995. Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin  $\alpha$ M290  $\beta_7$  ( $\alpha_E\beta_7$ ). *Eur. J. Immunol.* 25:852.
- Cepek, K. L., S. K. Shaw, C. M. Parker, G. J. Russell, J. S. Morrow, D. L. Rimm, and M. B. Brenner. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α<sub>E</sub>β<sub>7</sub> integrin. *Nature* 372:190.

- Sperling, M., P. Kaudewitz, O. Braun-Falco, and H. Stein. 1989. Reactivity of T cells in mycosis fungoides exhibiting marked epidermotropism with the monoclonal antibody HML-1 that defines a membrane molecule on human mucosal lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 134:955.
- 41. Pribila, J. T., A. A. Itano, K. L. Mueller, and Y. Shimizu. 2004. The  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_E\beta_7$  integrins define a subset of dendritic cells in peripheral lymph nodes with unique adhesive and antigen uptake properties. *J. Immunol.* 172:282.
- 42. Lefrancois, L., T. A. Barrett, W. L. Havran, and L. Puddington. 1994. Developmental expression of the  $\alpha$  IEL  $\beta_7$  integrin on T cell receptor  $\gamma\delta$  and T cell receptor  $\alpha\beta$  T cells. *Eur. J. Immunol.* 24:635.
- Smith, T. J., L. A. Ducharme, S. K. Shaw, C. M. Parker, M. B. Brenner, P. J. Kilshaw, and J. H. Weis. 1994. Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity 1:393*.
- 44. Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191:435.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 197:403.
- Cerf-Bensussan, N., A. Jarry, N. Brousse, B. Lisowska-Grospierre, D. Guy-Grand, and C. Griscelli. 1987. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17:1279.
- 47. Wang, D., R. Yuan, Y. Feng, R. El-Asady, D. L. Farber, R. E. Gress, P. J. Lucas, and G. A. Hadley. 2004. Regulation of CD103 expression by CD8<sup>+</sup> T cells responding to renal allografts. *J. Immunol.* 172:214.
- McKee, A. S., and E. J. Pearce. 2004. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.* 173:1224.
- Hesse, M., C. A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Prufer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A. W. Cheever, E. M. Shevach, and T. A. Wynn. 2004. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. J. Immunol. 172:3157.

- Noben-Trauth, N., R. Lira, H. Nagase, W. E. Paul, and D. L. Sacks. 2003. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major. J. Immunol. 170:5152.*
- Bluestone, J. A., and A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3:253.
- Schon, M. P., M. Schon, H. B. Warren, J. P. Donohue, and C. M. Parker. 2000. Cutaneous inflammatory disorder in integrin α<sub>E</sub> (CD103)-deficient mice. *J. Immunol.* 165:6583.
- Simonitsch, I., B. Volc-Platzer, I. Mosberger, and T. Radaszkiewicz. 1994. Expression of monoclonal antibody HML-1-defined α<sub>E</sub>β<sub>7</sub> integrin in cutaneous T cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 145:1148.
- 54. Walton, L. J., M. H. Thornhill, M. G. Macey, and P. M. Farthing. 1997. Cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) and α<sub>c</sub>β<sub>7</sub> integrins are expressed by mononuclear cells in skin and oral lichen planus. J. Oral Pathol. Med. 26:402.
- 55. de Vries, I. J., E. G. Langeveld-Wildschut, F. C. van Reijsen, I. C. Bihari, C. A. Bruijnzeel-Koomen, and T. Thepen. 1997. Nonspecific T-cell homing during inflammation in atopic dermatitis: expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen and integrin α<sub>E</sub>β<sub>7</sub> on skin-infiltrating T cells. J. Allergy Clin. Immunol. 100:694.
- Shimizu, J., and E. Moriizumi. 2003. Aging-dependent generation of suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>R123loCD103<sup>+</sup> T cells in mice. *Eur. J. Immunol. 33:2449.*
- Li, J., C. A. Hunter, and J. P. Farrell. 1999. Anti-TGF-β treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. J. Immunol. 162:974.
- Chatelain, R., K. Varkila, and R. L. Coffman. 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. J. Immunol. 148:1182.
- von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D. L. Sacks, and M. C. Udey. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. J. Exp. Med. 188:1547.
- Juliano, R. L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42:283.
- Kutlesa, S., J. T. Wessels, A. Speiser, I. Steiert, C. A. Muller, and G. Klein. 2002. E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103<sup>+</sup> thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J. Cell Sci.* 115:4505.

# Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo