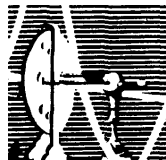


José Santos Gomes Filho

Desenvolvimento de uma vacina comestível para
a leishmaniose cutânea utilizando plantas
transgênicas de tabaco expressando o antígeno
LACK

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



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

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Desenvolvimento de uma vacina comestível para a leishmaniose cutânea utilizando plantas transgênicas de tabaco expressando o antígeno LACK

José Santos Gomes Filho

Prof^a Bartira Rossi Bergmann
Orientadora

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

Aprovada por:

Presidente, Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro
Maio/2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes-Filho, José Santos

Desenvolvimento de uma vacina comestível para a leishmaniose utilizando plantas transgênicas de expressando o antígeno LACK / José Santos Gomes Filho – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2008.

VIII, 75f: il.; 31 cm.

Orientador(a): Bartira Rossi Bergmann

Dissertação de Mestrado – UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências Bibliográficas: f. 61-75

1 - *Leishmania* 2 – Vacinas comestíveis 3 – Plantas transgênicas
4 - Mucosa 5 - LACK

I. Rossi-Bergmann, B. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

RESUMO

A indução de tolerância oral contra antígenos que aumentam a susceptibilidade a doenças tem despertado como uma estratégia factível de prevenção de algumas imunopatologias. Em trabalhos anteriores, foi visto que a imunização oral com o antígeno LaAg (lisado total de antígenos de *Leishmania amazonensis*) protegeu camundongos BALB/c contra a leishmaniose cutânea. Da mesma forma, um plasmídeo codificando o gene *LACK*, uma proteína componente do LaAg que sabidamente aumenta a susceptibilidade à leishmaniose quando administrado por via parenteral, induz imunidade protetora quando administrado por via nasal. Neste trabalho nós visamos o desenvolvimento de uma vacina oral comestível contra a leishmaniose utilizando tabaco transgênico expressando o antígeno LACK. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) foram transformadas pelo patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pGPTV-KAN-Asc codificando o gene *LACK*. Foram transformados 320 explantes foliares e a presença do transgene no genoma vegetal foi confirmada por PCR em 9 plantas. A produção da proteína LACK recombinante foi confirmada por dot-blot em apenas 1 das 9 plantas transformadas. A expressão do antígeno LACK recombinante nesta planta foi de 0.18% do total do peso foliar seco, ou 6% do total de proteínas solúveis. Para a vacinação, camundongos BALB/c (n=5) permaneceram em jejum por no mínimo 3h antes de receberem cada uma de duas doses de 20mg do liofilizado de folhas de tabaco transgênico contendo 36 µg LACK por gavagem intragástrica, em intervalo semanal. Outros grupos receberam 2 doses de LaAg (100 ug), planta selvagem ou PBS somente. Sete dias após a segunda dose, os animais foram desafiados na pata com 2×10^6 *L. amazonensis*, e no dia 7 de infecção a resposta de hipersensibilidade cutânea ao LaAg foi medida. Enquanto os animais-controles que receberam PBS ou tabaco selvagem reagiram normalmente ao antígeno, montando uma forte reação cutânea do tipo Jones-Mote com pico em 18h, esta reação tipo Th2 foi significativamente menor ($p < 0.001$) em animais que receberam LaAg ou a planta transgênica de tabaco. Esta tolerização a antígenos do parasito foi seguida de proteção parcial contra a infecção, onde os animais vacinados com a planta transgênica desenvolveram uma lesão mais lenta e uma menor carga parasitária que os grupos que receberam a planta selvagem ou PBS. A proteção conferida pela planta transgênica foi até mesmo superior à conferida pela vacina LaAg. Estes resultados mostram o potencial desta vacina comestível, capaz de induzir tolerância periférica a antígenos deletérios do parasito, e ao mesmo tempo favorecer uma imunidade protetora contra a leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Induction of oral tolerance to antigens that increase the susceptibility to diseases has emerged as a feasible strategy to prevent immunopathologies. Previously, it was found that oral immunization with the parasite antigen LaAg (whole *Leishmania amazonensis* lysate) protects BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis. Likewise, a DNA plasmid encoding *LACK*, a LaAg protein component that promotes disease when administered through parenteral routes, induced protective immunity when administered in the nasal mucosa. In this work we attempted to develop an edible vaccine against leishmaniasis using transgenic tobacco expressing *LACK*. Thus, *Nicotiana tabacum* L. plants were transformed by the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* containing the pGPTV-KAN-Asc plasmid containing the *LACK* gene. We transformed 320 leaf explants but the presence of the transgene was confirmed by PCR in 9 plants and the production of *LACK* protein was confirmed by dot-blot in only 1 of the 9 transformed plants. *LACK* expression in that plant was 0.18% of total dry leaf tissue or 6% of the total soluble proteins. For vaccination, BALB/c (n=5) mice were fasted for at least 3 h before receiving each of two doses of 20 mg of tobacco lyophilized powder containing 36 µg of *LACK* by intragastric gavage, allowing one-week interval. Other groups received 2 doses of LaAg (100 µg), the wild-type plant or PBS. Seven days after the second dose the animals were challenged in the footpad with 2×10^6 *L. amazonensis*, and on day 7 of infection the cutaneous hypersensitivity response to LaAg was evaluated. We found that whereas animals receiving wild-type tobacco or PBS reacted normally to the antigen, mounting a strong TH2-related Jones-Mote cutaneous reaction that peaks in 18 h, the reaction was significantly lower ($p < 0.001$) in animals receiving LaAg or the transgenic tobacco. Tolerization to parasite antigens was followed of partial protection against infection, where the animals vaccinated with the transgenic plant developed a slower growing lesion and a lower parasite burden than controls receiving the wild-type plant or PBS. The protection conferred by the transgenic plant was even superior to achieved with LaAg. These results indicate the feasibility of using this edible vaccine that down-regulate peripheral deleterious antileishmanial responses in a manner that favor protective immunity against cutaneous leishmaniasis.

Lista de Abreviaturas

Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
Con A	Concanavalina A
CPG-ODN	Seqüências Citosina-fosfato-Guanosina Oligodeoxinucleotídeo
D-MEM	Meio essencial mínimo Dulbecco
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FML	Ligante de fucose manose
Fig.	Figura
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfônico
i.d.	Intradérmica
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
LaAg	Antígeno total de <i>Leishmania amazonensis</i>
LACK	Homólogo ao receptor de proteína quinase C ativada
LACK DNA	Plasmídeo pCI-neo com o gene LACK
LPS	Lipopolissacarídeo
NK	Células matadoras naturais (Natural killer)
OMS	Organização Mundial de Saúde

OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato salina
Sb ⁺⁵	Antimonial pentavalente
s.c.	Subcutânea
SFBI	Soro fetal bovino inativado
T CD4+	Linfócito T auxiliar
T CD8+	Linfócito T citolítico
TGF- β	Fator de transformação e crescimento-beta
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TLR	Receptores semelhantes a Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TSP	Total de proteínas solúveis

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, em especial:

A meu Deus, pelo milagre em minha vida e pelo sustento, dia após dia.

A Prof^a Bartira Rossi Bergmann, pela oportunidade, amizade, confiança, e principalmente pela enorme paciência. Obrigado.

Ao Prof. Ekehard Hansen, pela orientação na parte de biologia molecular. Não conseguiríamos concluir este trabalho sem sua ajuda.

A Beatriz Lilian, pela conversas, pela confiança e pela boa vontade de sempre.

Ao Wallace Pacienza, companheiro de laboratório e de casa, por nossas constantes conversas e pela amizade.

Ao Fred e a Carol, pela amizade e pelas conversas.

Ao Dr. Eduardo Fonseca (Zinho) pelas sugestões e pela ajuda constante nos experimentos.

À Elaine dos Anjos, pela imensa paciência e ajuda nos ELISAs!

A todos os amigos do Laboratório de Imunofarmacologia: Caio, Daniel, Herbert, Rodrigo, Suzana, Camila, Carol, Vanessa, Michelle, D. Josy, Natália, Isabela, Silvia, pela ajuda, amizade e pelos momentos de descontração!

À Sandrinha Pós-graduação, pela disposição e boa vontade em resolver nossos problemas!

Aos meus pais José e Sonia e ao meu irmão Bruno pelo apoio incondicional e constante em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

A Claudia, minha linda, meu grande amor, minha força nas horas de desânimo por todo apoio e carinho. Vou te amar para sempre!

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pela formação.

Ao CENPES, pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

1- Introdução	1
1.1 – As Leishmanioses	2
1.2 – Manifestações Clínicas	4
1.3 – Epidemiologia	6
1.4 – Controle	7
1.5 – Resposta Imune	9
1.6 – Vacinas	11
1.7 – O antígeno LACK	14
1.8 – Tolerância Oral	16
1.9 – Plantas como Bioreatores	18
1.10 – Vacinas comestíveis	21
1.11 – Tabaco como Bioreator	22
2- Objetivos	25
3 - Material e Métodos	26
3.1– Construção dos plasmídeos recombinantes pGLACK e pGLACKER	27
3.2–Transferência dos plasmídios recombinantes pGLACK e pGLACKER para <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
3.3 – Desinfecção e germinação de plantas transgênicas de tabaco	35
3.4 – Micropropagação de plantas transgênicas de tabaco	35
3.5 – Transformação de tecido foliar de tabaco	35
3.6 – Confirmação da presença de transgene por PCR	37
3.7 – Extração de proteínas	38
3.8 – Avaliação da expressão da proteína LACK por Dot blot	38
3.9 – Análise Densitométrica	39
3.10 – Aclimação das plantas no solo	40
3.11 - Preparo das folhas para vacinação	40
3.12 – Parasitos	40
3.13 – Preparação do antígeno LaAg	41
3.14 – Camundongos	41
3.15 – Imunização	41
3.16 – Infecção	42
3.17 – Determinação da carga parasitária	42
3.18 – Reação de hipersensibilidade cutânea de Jones-Mote	43
3.19 – Análise Estatística	43
4 – Resultados	44

4.1 – Transformação do tabaco	45
4.2 – Análise das plantas transformadas por PCR	46
4.3 – Análise da expressão do transgene	46
4.4 – Efeito da vacinação com a planta transgênica LACK+ na hipersensibilidade cutânea a antígenos de <i>Leishmania</i>	48
4.5 – Eficácia da vacinação com a planta transgênica LaCK+ no controle da infecção por <i>L. amazonensis</i>	51
5 – Discussão	53
6 – Referências	61

1. Introdução

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes à Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, que ainda é subdividido nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON e SHAW, 1987). O subgênero *Viannia* compreende principalmente as espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* encontradas nas Américas tropical e subtropical, enquanto o subgênero *Leishmania* é constituído principalmente pela *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*, encontrados no Velho Mundo ou nas Américas.

A *Leishmania* é um protozoário pleomórfico que possui dois estágios em seu ciclo de vida: um estágio flagelado móvel, denominado promastigota, que se desenvolve extracelularmente dentro do trato alimentar do vetor flebotomíneo, e um estágio amastigota, que ocorre dentro dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Esses, são principalmente mamíferos, sendo os seres humanos, cães e várias espécies de roedores os mais comumente infectados (LAINSON e SHAW, 1987; MURRAY *et al.*, 2005).

Conforme mostra a figura 1, a transmissão do parasito ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo regurgita a forma infectante (promastigota metacíclica) juntamente com sua saliva durante o repasto sanguíneo (1) (MURRAY *et al.*, 2005; <http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/leishmanioses.htm>). A saliva dos flebotomíneos contém substâncias com atividades imunomoduladoras, vasodilatadoras e anticoagulantes como a maxadilan, que levam ao aumento da quimiotaxia de macrófagos, resultando no aumento da fagocitose, inibição da apresentação de antígeno para linfócitos T, inibição da produção de citocinas Th1,

redução da ativação celular causada pela ação de IFN- γ e regulação negativa da produção de óxido nítrico. Dessa forma, a saliva dos flebotomíneos cria um ambiente adequado para o repasto sanguíneo, mas parece também ser importante para o estabelecimento da *Leishmania* (BRODIE *et al.*, 2007).

As promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos (2). No vacúolo parasitóforo (fagolisossomo) se diferenciam em amastigotas (3) e sofrem sucessivas divisões binárias, acarretando dentro de alguns dias a lise do macrófago (4) e a liberação dos parasitos, que poderão infectar macrófagos adjacentes. O ciclo se completa quando outro inseto vetor suga o sangue contaminado (5) e no intestino médio, as amastigotas ingeridas se transformam em uma forma flagelada e alongada denominada promastigotas procíclicos, que se dividem rapidamente e sofrem uma série de modificações morfológicas num processo denominado metaciclogênese (6 e 7). Finalmente, ao final da metaciclogênese, se diferenciam em promastigotas metacíclicos, que habitam a proboscide, em uma posição que facilita a transmissão na hora da picada (8). A classificação em subgêneros acima citada se dá de acordo com o desenvolvimento desses protozoários no tubo digestivo do inseto vetor. Assim, espécies cujo desenvolvimento ocorre na porção média e anterior, são classificadas como pertencentes ao subgênero *Leishmania*; e aquelas que têm seu desenvolvimento na porção média e posterior do intestino do inseto vetor são classificadas como pertencentes ao subgênero *Viannia* (ROGERS, *et al* 2004; MURRAY *et al.*, 2005; FIOCRUZ, 2005; ROBERTS, 2006).

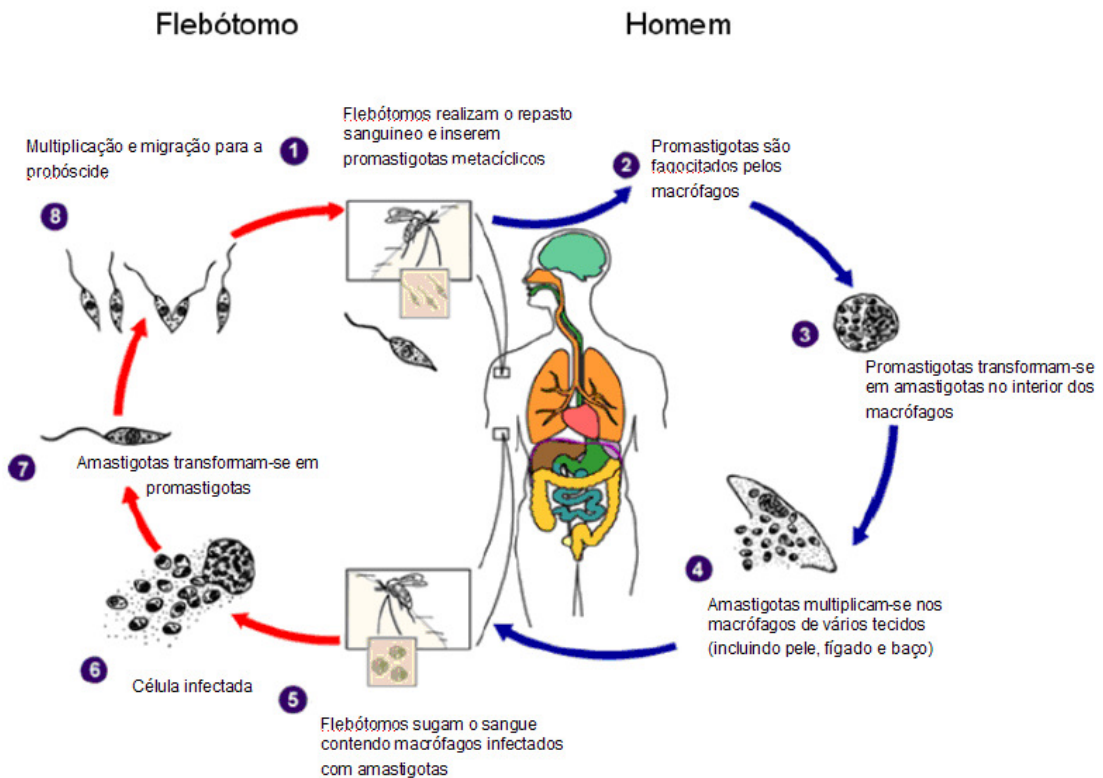


Fig. 1 – Ciclo de vida de *Leishmania sp.*
 Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2004
 (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.2 – Manifestações Clínicas

Baseados nos sintomas clínicos, as leishmanioses podem ser classificadas em 4 grupos:

- Leishmaniose Cutânea (LC): De ocorrência mais comum, corresponde a 50% dos novos casos de leishmaniose. São causadas pelas espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) guyanensis* no Novo Mundo e por *L. (L.) major* no Velho Mundo (CONVIT *et al.*, 1972). Caracteriza-se por úlceras na pele, no local da picada dos flebótomos, ocorrendo usualmente nas áreas descobertas do corpo, como rosto, braços e pernas. A lesão geralmente é curada espontaneamente, mas o tempo de resolução das lesões varia entre as

espécies e os indivíduos (GRIMALDI, JR & TESH.,1993; NEVES, 2002; SINGH *et al.*, 2006).

- Leishmaniose Mucocutânea (LMC): ou espúndia apresentam lesões que produzem destruição extensiva e desfigurante da mucosa da garganta, nasal e bucal. Geralmente causada por *L.(V.) braziliensis*, é causada por uma infecção secundária à forma cutânea simples, e está associada a uma intensa resposta do tipo hipersensibilidade tardia, com poucos macrófagos infectados e uma grande destruição do tecido mucoso e submucoso das cavidades nasal e oral. Quando não tratada pode levar a severas deformidades faciais (NEVES, 2002; WHO, 2005).
- Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD): causada principalmente por parasitas das espécies *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo e por *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) venezuelensis* no Novo Mundo. Caracteriza-se por produzir grande número de lesões com grande número de parasitas. Está relacionada com hospedeiros com uma resposta imune defeituosa, possuindo macrófagos altamente infectados e pouca resposta linfoproliferativa. As três formas da doença acima citadas são classificadas em um grupo denominado Leishmaniose Tegumentar (GRIMALDI, JR & TESH.,1993; NEVES, 2002; WHO, 2005).
- Leishmaniose Visceral (LV): também conhecida como Kala-Azar é a forma mais severa da doença com alto índice de mortalidade (90% dos casos quando não tratada) principalmente pela imunossupressão e por infecções secundárias. Causada principalmente por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e *L.*

(*L. donovani*), caracteriza-se principalmente pelo parasitismo de órgãos importantes como baço, fígado e medula óssea. Além disso, verifica-se aumento dos linfonodos, pneumonia intersticial, fibrose septal, nefrite intersticial, anemia, hipergamaglobulinemia, diminuição plaquetária, febre e estado de debilidade progressivo (GRIMALD, JR & TESH.,1993; NEVES, 2002; WHO, 2005).

1.3 – Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 88 países em 4 continentes (Américas, Europa, Ásia e África), havendo 350 milhões de pessoas sob risco de infecção. Por ano surgem 2 milhões de novos casos (cerca de 1,5 milhão de casos de leishmaniose tegumentar e 500 mil casos de leishmaniose visceral), formando um total de 12 milhões de pessoas infectadas (MAZUMDER *et al.*, 2007). Aproximadamente 90% dos novos casos de leishmaniose ocorrem em países como a Índia, Bolívia, Sudão, Nepal, Peru e Brasil (WHO, 2005; GRAMICCIA e GRADONI, 2005) (Fig. 2). A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde, como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (WHO, 2005).

Desde 1993, as áreas endêmicas têm se expandido, produzindo números recordes de casos da doença. Essa expansão se dá principalmente devido à migração rural-urbana e ao desmatamento, que destrói o habitat natural do inseto transmissor. Além disso, a infecção por HIV e outras condições de

imunossupressão podem aumentar os casos de leishmaniose visceral (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

No Brasil, o número de casos tem aumentado a cada ano, com registro de casos em todas as regiões brasileiras. Outro fato importante é que em grande parte do país há uma sobreposição de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar e visceral. A partir da década de 80, verifica-se o aumento no número de casos registrados, variando de 3000 em 1980 a 40.000 em 2002 (WHO-TDR, 2002).

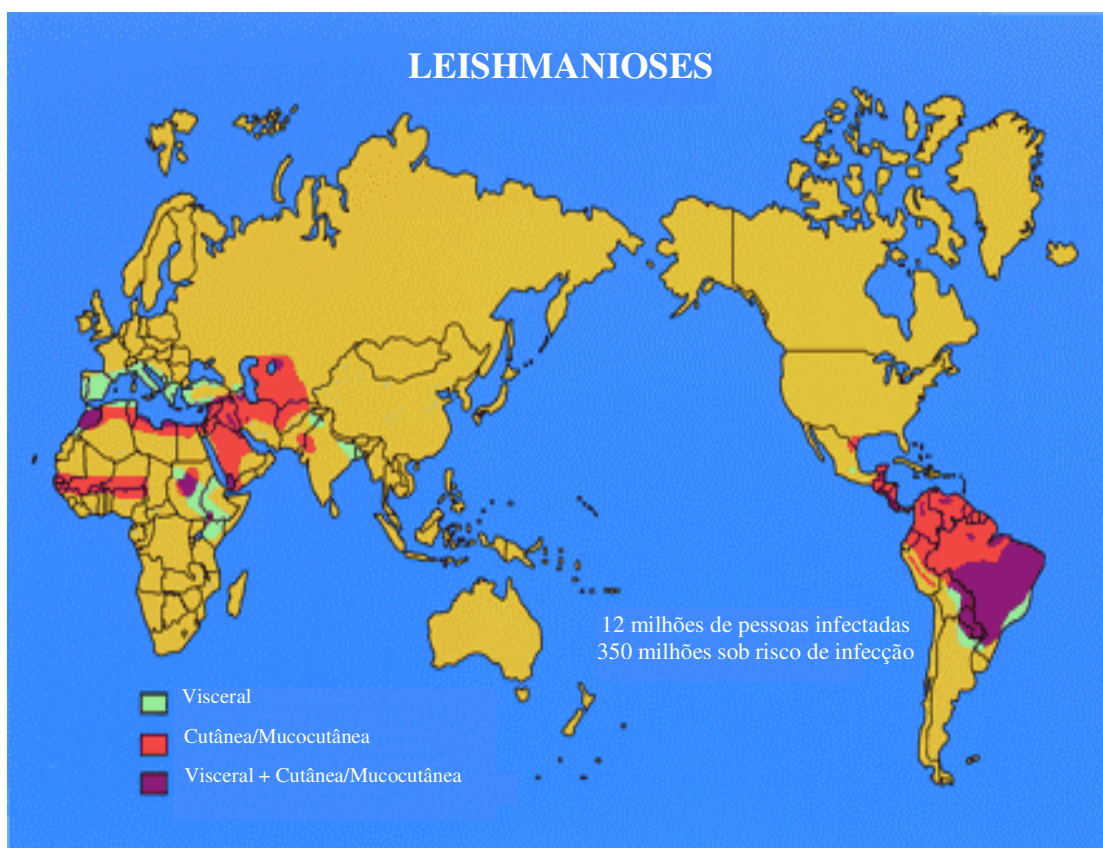


Fig. 2 – Mapa mundi mostrando regiões onde a leishmaniose é endêmica.
Fonte: Walter and Elisa Hall Institute (www.wehi.edu.au)

1.4 – Controle

A transmissão das leishmanioses é de difícil controle em virtude da variedade de espécies do parasita, já que cada espécie possui um padrão epidemiológico único. Atualmente, as estratégias de controle são baseadas em medidas convencionais como a eliminação do vetor, eliminação dos reservatórios, supervisão, proteção pessoal e tratamento (Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana, 2007; GRIMALDI JR., 1995).

A primeira linha de tratamento é predominantemente baseada nos antimoniais pentavalentes, um tratamento clássico na maioria das áreas endêmicas. Porém, apresenta inúmeras contra-indicações, como por exemplo a não indicação para gestantes, a pacientes acima de 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e Doença de Chagas. Sua eficiência tem sido comprometida com o aparecimento de resistência, particularmente a *L. donovani* na Índia. A segunda linha de tratamento inclui medicamentos como a anfotericina B e pentamidina, que são altamente eficazes, porém provocam diversos efeitos colaterais (BERMAN, 2003; DAVIS e KEDZIERSKI, 2005). A anfotericina B atua nas formas amastigotas (*in vivo*), interferindo na membrana plasmática devido a sua alta afinidade por esteróis com esqueleto ergostano, presentes na membrana desses microorganismos. Com sua ligação a esses esteróis são formados poros na membrana, levando a um aumento de permeabilidade e morte do parasito. Seus efeitos adversos incluem febre, náuseas e vômitos, podendo produzir efeitos nefrotóxicos severos devido à sua baixa solubilidade. Já a pentamidina, atua sobre o metabolismo da glicose. Entretanto sua utilização é contra-indicada em casos de gestação, *diabetes mellitus*, insuficiência renal e hepática, doenças cardíacas e

em crianças com peso inferior a 8 Kg. Novos fármacos, como formulações lipídicas da anfotericina B, são bastante eficazes no tratamento da leishmaniose visceral, e apesar de sua reduzida toxidez o alto custo desta formulação o torna inviável para a maioria dos pacientes (BERMAN *et al.*, 1998; MURRAY, 2005). Os medicamentos acima citados são injetáveis, o que aumenta o custo de administração pela necessidade de material adequado e pessoas qualificadas. Outra desvantagem destes medicamentos é o tratamento prolongado que favorece o aparecimento de resistência. Recentemente a administração oral da miltefosina tem se mostrado eficaz no tratamento da leishmaniose visceral na Índia (SUNDAR e RAI., 2002) e da leishmaniose cutânea na América do Sul (SOTO *et al.*,2006).

As diversas limitações encontradas nos fármacos disponíveis para o tratamento contra as leishmanioses, bem como, as dificuldades no controle dos insetos vetores e reservatórios (como os cães) do protozoário, tornam evidente a necessidade do desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras.

1.5 – Resposta imune

Para um melhor entendimento das vacinas experimentais, será feita uma abordagem sobre a resposta imune nas leishmanioses.

A patologia das infecções por *Leishmania* é determinada não só pelas espécies de parasitas, mas também por fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro. A resistência adquirida à leishmaniose é mediada por células T, já que, camundongos deficientes em células T sucumbem rapidamente após a infecção (REINER e LOCKSLEY, 1995; PINTADO e LOPES-VELEZ, 2001). A

resistência à doença é readquirida através da transferência adotiva dessas células. As células T CD4+ são cruciais na resistência à infecção, enquanto que as células T CD8+ têm uma maior participação nos eventos de memória do que na eliminação do parasita. Além disso, células T regulatórias CD4+CD25+ foram identificadas como fontes importantes de IL-10, sendo responsáveis por infecções persistentes de *L. major* (BELKAID, 2002; COLER e REED, 2005).

Na leishmaniose cutânea murina, uma proteção efetiva contra a infecção tem sido atribuída ao desenvolvimento de uma potente resposta do tipo CD4+Th1, caracterizada pela produção de IL-12 e INF- γ , que subsequentemente medeia a ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico e morte do parasita (ROGERS *et al.*, 2002; BELKAID., 2002; ALEXANDER e BRYSON, 2005). Uma polarização tão clara da resposta de células T helper não é evidente na leishmaniose humana, mas há uma boa relação entre a resposta Th1 e resistência à leishmaniose cutânea (KEMP e THEANDER, 2000). Uma resposta Th2 está relacionada com uma falha na criação de uma resposta protetora, causando assim, lesões de longa duração e infecção sistêmica. Geralmente, uma predominância de células que produzem IFN- γ ocorre na cura, entretanto, tanto nos casos crônicos quanto nas lesões de mucosa há uma mistura de citocinas Th1 e Th2, com abundância de IL-4 e IL-10. Na leishmaniose visceral parece não haver nenhuma associação entre o aumento de IL-4 e a progressão da doença, entretanto, há uma relação direta entre produção de IL-10 e susceptibilidade a doença (GHALIB *et al.*,1993; KHARASMI *et al.*, 1999; VON STEBUT e UDEY, 2004;).

Também em humanos, recentemente foi demonstrado que as células T CD8+ parecem ter um importante papel contra a leishmaniose cutânea. Similarmente, a imunidade inata, incluindo as células NK, IL-1 α e o fator mielóide de diferenciação 88 (MyD 88) atuam como imunomoduladores determinando a resistência inicial à infecção. Além disso, receptores toll-like tipo 2 tem um importante papel em orquestrar o tipo e a intensidade dessa resposta (revisão por HANDMAN, 2001; BORGES *et al.*, 2001). A cicatrização e os mecanismos de reparo de tecidos também têm sido citados como fatores de resistência à leishmaniose (SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2005).

Estudos recentes na produção e manutenção de células T CD4+ relacionadas à memória central (MC) e à memória efetora (ME) durante a leishmaniose cutânea abrem novos horizontes na criação de estratégias de vacinação efetivas contra a leishmaniose (GOLLOB *et al.*, 2005; SCOTT, 2005). No modelo murino, foi sugerido que a constante presença de parasitas vivos é necessária para a manutenção das células T CD4+ ME (SEDER e SACKS, 2004; ZAPH *et al.* 2004). Assim a eficácia de vacinas de subunidades ou utilizando parasitas mortos pode ser aumentada através da utilização de adjuvantes que favoreçam a geração de células T CD4+ MC.

Um outro fator que parece ter influência na resposta à leishmaniose é a resposta de hipersensibilidade. Esta é uma medida de atividade celular envolvendo uma série de interações entre as células T e os fagócitos. Dependendo do tipo de resposta de hipersensibilidade, tardia (também conhecida como tuberculínica ou DTH) cujo pico se dá em 48h ou Jones-Mote, cujo pico se

dá em 15-18h, ela pode estar relacionada com a proteção ou susceptibilidade à leishmaniose. Assim, enquanto a resposta tipo tuberculínica parece estar associada à resistência à *L. major* (HOWARD *et al.*, 1980) e é positivamente modulada por células Th1 (MOSMANN e COFFMAN *et al.*, 1989), a resposta do tipo Jones-Mote parece estar associada à exacerbação da doença (DHALIWAL e LIEW., 1987; TITUS *et al.*, 1984). Quanto aos tipos de células envolvidas, observa-se que na resposta tuberculínica há presença de um infiltrado de células mononucleares, enquanto na reação de Jones-Mote em cobaias envolve predominantemente polimorfonucleares no sítio da administração do antígeno (DHALIWAL e LIEW., 1987). Apesar de não haver registro na literatura, observações em nosso laboratório mostram que o tipo de infiltrado polimorfonuclear, aliado à sua associação com uma resposta deletéria na leishmaniose apontam para uma resposta do tipo Th2 para a reação de Jones-Mote. Assim, podemos sugerir que camundongos BALB/c (susceptíveis à infecção por *Leishmania*) quando infectados por *L. amazonensis* montam naturalmente uma resposta de hipersensibilidade do tipo Jones-Mote. Em um trabalho anterior de nosso laboratório (PINTO *et al.*, 2003) foi observado que vacinas experimentais que conferiram proteção a camundongos BALB/c contra a leishmaniose, foram capazes de suprimir a resposta inicial de Jones-Mote. Dessa forma, a supressão da resposta de Jones-Mote pode ser considerada um fator importante na proteção contra a leishmaniose.

1.6 – Vacinas

Para fins didáticos, as vacinas anti-leishmaniais podem ser classificadas em vacinas de primeira, segunda e terceira geração, de acordo com sua composição.

As vacinas de primeira geração são aquelas compostas de microorganismos mortos ou atenuados, ou ainda de misturas não caracterizadas de antígenos. Um exemplo deste tipo de vacina, denominado leishmanização, consiste na inoculação de promastigotas virulentos de *L. major* em partes cobertas do corpo normalmente não expostas, evitando-se assim o estabelecimento de infecções naturais em áreas expostas como a face. Na década de 70, foi desenvolvida por Mayrink e colaboradores uma vacina composta por parasitos mortos de quatro espécies diferentes (GENARO *et al.*, 1996). Posteriormente simplificada, passou a conter somente o lisado de *L. amazonensis*. A então denominada Leishvacin® passou a ser produzida pela BioBrás em Montes Claros (MG). Entretanto, sua produção industrial foi descontinuada, apesar de estudos clínicos de Fase I atestarem sua segurança (MARZOCHI *et al.*, 1998) e de fase II, atestarem sua imunogenicidade (DE LUCA *et al.*, 1999). Como demonstrado por nosso grupo (PINTO *et al.*, 2003), a imunização oral com antígeno total de *L. amazonensis* (LaAg) é um outro exemplo do emprego de vacinas de 1ª geração. Naqueles trabalhos foi observado que a imunização oral (PINTO *et al.*, 2003) e nasal (PINTO *et al.*, 2004) com LaAg conferiu proteção parcial contra a infecção homóloga em camundongos.

Já as vacinas de segunda geração são aquelas compostas por vacinas vivas geneticamente modificadas, frações e proteínas recombinantes. As vacinas vivas incluem promastigotas de *Leishmania* geneticamente modificadas que causariam

uma infecção abortiva, como um clone de *L. major* do qual foi removido o gene para a proteína diidrofolato redutase/timidilato sintetase (CRUZ *et al.*, 1991). Para a produção de vacinas de subunidades, diversas proteínas de *Leishmania* têm sido identificadas baseadas em sua abundância, localização na superfície, clones de células T, seleção em “pools” antigênicos e seleção em bibliotecas de expressão com soro de animais ou humanos infectados. Essas incluem a glicoproteína 63 (gp63), a glicoproteína de membrana 46 (gp46), a proteína de *Leishmania* Homóloga de Receptores de Quinase C Ativada (*Leishmania* Homologue of Activated C Kinase, LACK), objeto desse estudo, proteinase cisteínica B e A, antígenos LD1, o antígeno de superfície de promastigota 2 (SA2), histona H1, fator de alongação e iniciação de *Leishmania* (LeifF), entre outras (COLER e REED, 2005). Entre as vacinas com subunidades definidas testadas, destacam-se o antígeno gp63 (RUSSO *et al.*, 1991), LeIF, análogo recombinante da proteína ribossomal eucariótica (SHEIKY *et al.*, 1994) e o FML (ligante de fucose e manose) de *L. donovani*. O FML previne o aumento da carga parasitária e o aparecimento de sinais clínicos da doença em hamsters e camundongos (SANTOS *et al.*, 2003) e em cães (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; AGUILAR-B *et al.*, 2005), e está atualmente sendo produzido industrialmente para uso veterinário por via injetável contra o calazar canino.

As vacinas de terceira geração são as chamadas vacinas gênicas, onde genes que codificam antígenos potencialmente imunizantes são carregados por plasmídeos. Em fase experimental, alguns estudos realizados, inclusive em nosso laboratório, mostram que a administração de vacinas de DNA s.c. e por via nasal a camundongos BALB/c confere proteção contra *L. major* ou *L. amazonensis*

(GURUNATHAN *et al.*, 1997; GONZALO *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2004, GOMES *et al.*, 2007). Em outro trabalho (MÉNDEZ *et al.*, 2002), um coquetel de DNA codificando diversos antígenos de *Leishmania* foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 contra *L. major*.

A utilização de vacinas de DNA apresenta algumas vantagens como a capacidade de codificar proteínas com estrutura e conformação similares ou idênticas às das proteínas selvagens, capacidade de gerar respostas humorais e celulares mais prolongadas e de permitir a combinação de diversos imunógenos em uma preparação única (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Estas características facilitam a imunização simultânea contra doenças diversas, além de trazer vantagens econômicas pela tecnologia do DNA recombinante, o que torna mais fácil a elaboração e a geração de grandes quantidades da vacina, além também da facilidade de armazenamento devido à alta estabilidade do DNA em relação às proteínas (WEINER & KENNEDY, 1999). Além disso, os plasmídeos utilizados nas vacinas de DNA apresentam seqüências Citosina-fosfato-Guanosina Oligodesoxinucleotídeo (CpG ODN) (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Elas são 16 a 20 vezes mais comuns em bactérias se comparados a mamíferos e se ligam ao Receptor Tipo Toll-9 (TLR-9) presente em macrófagos e em células dendríticas (MEDZHITOV *et al.*, 2001; VOLLMER *et al.*, 2005). Esta característica permite que elas ajam como importantes adjuvantes nos processos de vacinação que visam o direcionamento de resposta Th2 para Th1, pois elas induzem a produção de IFN- γ e IL-12 (KLINMAN *et al.*, 1996). Porém esta estratégia, particularmente em vacinas injetáveis, apresenta também algumas desvantagens como a

possibilidade de integração ao genoma do hospedeiro (aumentando o risco de malignidade por ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor) e de indução de respostas contra as células transfectadas (levando ao estabelecimento de doenças auto-imunes) (GURUNATHAN *et al.*, 2000).

1.7 – O antígeno LACK

O LACK (proteína de *Leishmania* Homóloga de Receptores de Quinase C Ativada) é um antígeno de 36 KDa altamente conservado entre as espécies de *Leishmania* e é expresso tanto na forma amastigota como na promastigota (MOUGNEAU *et al.*, 1995; OKUNO *et al.*, 2002). Localizado no citoplasma próximo ao cinetoplasto, parece estar ligado a complexos multiproteicos provavelmente tendo um papel na regulação da expressão gênica no cinetoplasto (MOUGNEAU *et al.*, 1995). A susceptibilidade dos camundongos à infecção com *L. major* é correlacionada com a polarização de células Th2 parasito-específicas, sendo LACK o principal responsável pela expansão dessas células, por ativar T CD4⁺ que expressam TCR V β 4/V α 8 produtores de IL-4 que se expandem rapidamente após a infecção (LAUNOIS *et al.*, 1997). Assim, a própria resposta imune, induzida pela presença de LACK no patógeno, é diretamente responsável pela susceptibilidade à doença (MCSORLEY e GARSIDE, 1999).

Intervenções imunes direcionadas para a modificação do repertório de células T podem ser usadas para alterar o curso de uma infecção, e a possibilidade de modular esta rápida resposta imune anti-LACK através de IL-12 e INF- γ exógenos sugere que estas células ainda não estão totalmente maduras na resposta Th2,

podendo então ser redirecionadas. Além disso, a vacinação com a proteína LACK juntamente com a IL-12 recombinante induz a uma resposta Th1 protetora (AFONSO *et al.*, 1994; MOUGNEAU *et al.*, 1995). Ao contrário da proteína LACK, que sozinha aumenta a predisposição à doença, plasmídeos codificando LACK têm sido utilizados para a produção de vacinas contra a leishmaniose, se mostrando eficaz em várias metodologias de vacinação (TAPIA *et al.*, 2003; SOUSSI *et al.*, 2002; RAMIRO *et al.*, 2003; GONZALO *et al.*, 2002). Em trabalhos realizados em nosso laboratório, foi observado que a administração de LACK DNA por via nasal é capaz de proteger camundongos BALB/c contra a infecção por *L. amazonensis* e *L. chagasi* (PINTO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2007). Vários protocolos de imunização com a proteína LACK ou com seu gene codificante têm sido testados contra diferentes espécies de *Leishmania*. A vacinação subcutânea com p24 LACK-DNA levou à proteção contra desafio com *L. major* em camundongos BALB/c de maneira similar à proteção induzida por proteína p24(LACK) mais IL-12 (GURUNATHAN *et al.*, 1997). A imunização s.c. com p36(LACK) de *L. infantum* e reforço com vírus Vaccinia com insertos dos genes p36(LACK) e IL-12 (VVp36IL-12) induziu redução no tamanho de lesão e da carga parasitária no mesmo modelo (GONZALO *et al.*, 2001). Em cães, um protocolo similar utilizando p36LACK-DNA e reforço com vírus Vaccinia recombinante com inserto do gene p36(LACK) (rVV p36LACK) protegeu os animais contra leishmaniose visceral causada por *L. infantum* (RAMIRO *et al.*, 2003). A vacinação com p36(LACK) DNA pelas vias i.d. e s.c. induziram forte resposta do tipo Th1, com produção de IFN- γ , porém esta resposta não foi capaz de conferir proteção

contra o desafio com *L. donovani* (MELBY *et al.*, 2001) ou *L. amazonensis*. No entanto, a imunização i.d. com a associação de p36(LACK) DNA com plasmídeos expressando os genes de IL-12 e IL-18, seguido de reforço com vaccinia vírus expressando o gene p36(LACK) conferiu significativa proteção contra *L. major* em camundongos BALB/c, levando a uma significativa redução do tamanho da lesão, diminuição da carga parasitária, aumento na produção de IFN- γ e de IgG2a (TÁPIA *et al.*, 2003).

1.8 Tolerância Oral

O termo “tolerância oral” tem sido definido como a supressão da resposta imune celular e/ou humoral sistêmica em resposta à administração de um antígeno por via oral. Este mecanismo provavelmente evoluiu de forma análoga à tolerância tímica a antígenos próprios para prevenir respostas de hipersensibilidade tanto a proteínas presentes nos alimentos como aos antígenos dos microrganismos da flora intestinal (FARIA e WEINER, 2005).

O fenômeno foi primeiramente descrito em 1911 quando Wells alimentou cobaias com proteínas de ovo de galinha e verificou que os animais eram resistentes a anafilaxia quando desafiados. Em 1946, Chase alimentou cobaias com dinitroclorobenzeno (DNCB) e observou que a reatividade da pele dos animais ao composto havia diminuído. Subseqüentemente, numerosos investigadores mostraram que animais alimentados com eritrócitos de ovelha ou proteínas, tais como a ovoalbumina (OVA), também não respondiam a esses

antígenos quando imunizados, mas respondiam normalmente a outros antígenos (citado em WEINER, 1997).

Sabe-se atualmente que os mecanismos que medeiam a tolerância oral incluem a indução de células T regulatórias que medeiam a supressão ativa, e a indução de anergia ou deleção clonal. O fator determinante do mecanismo é a dose de antígeno administrada. Baixas doses antigênicas favorecem uma supressão ativa, gerando células regulatórias antígeno específicas que migram para os órgãos linfóides suprimindo respostas imunes pela inibição de células efetoras. Altas doses resultam na anergia/deleção clonal em células T específicas no intestino e na apresentação sistêmica do antígeno após a passagem através do intestino (WHITACRE *et al.*, 1991; Revisado por WEINER e MAYER, 1996; WEINER, 1997; ABBAS *et al.*, 1998; GARSIDE e MOWAT, 2001).

A administração oral do antígeno LACK, seria uma alternativa de tolerização contra o LACK. Através desta abordagem, espera-se o desenvolvimento de tolerância oral ao antígeno impedindo sua atuação na indução da resposta imune Th2, protegendo o indivíduo contra infecções por *Leishmania sp.* O uso de uma abordagem tolerogênica para desenvolver imunidade protetora tem um precedente no modelo de Liew e colaboradores, os quais documentaram o efeito protetor da administração intravenosa de parasitas irradiados antes da infecção (HOWARD *et al.*, 1982; HOWARD *et al.*, 1984; LIEW *et al.*, 1985). Foi sugerido que este protocolo ativaria linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 (LIEW *et al.*, 1984). Posteriormente foi mostrado que na verdade este protocolo reduz a frequência de linfócitos T específicos para *Leishmania* (AEBISCHER *et al.*, 1994). Portanto, ao contrário do dogma que associa memória imunológica com imunidade protetora, a indução de

tolerância pode ter um efeito benéfico geral na infecção subsequente (MCSORLEY e GARSIDE, 1999). A expressão transgênica de LACK no timo de camundongos susceptíveis evita o desenvolvimento de células reativas a LACK e tais camundongos recuperam-se da infecção (JULIA *et al.*, 1996). Um exame das respostas dos linfócitos T desses camundongos a outros antígenos do parasita demonstrou que elas eram do tipo Th1, ao contrário das respostas do tipo Th2 observadas nos camundongos não transgênicos infectados. Camundongos seletivamente exauridos de linfócitos T TCR V β 4/V α 8 não desenvolveram lesões progressivas quando infectados com *L. major* (LAUNOIS *et al.*, 1997). Esses dados sugerem que as respostas aos antígenos de *Leishmania*, excetuando-se a proteína LACK, são de natureza essencialmente protetora, mas são incapazes de superar o efeito dominante da população do tipo Th2 reativa à LACK. Mesmo em camundongos resistentes, nos quais os efeitos da responsividade à LACK são eventualmente superados, a remoção artificial da população de linfócitos T específicos para LACK pela expressão de LACK no timo acelera a taxa normal de cura (JULIA *et al.*, 1999). Desta forma, uma abordagem bastante diferente da abordagem clássica onde a geração de imunidade protetora usando vacinas tolerogênicas pode ser tentada, na qual o silenciamento de uma população indesejada é suficiente para permitir que o resto do sistema imune funcione de uma maneira protetora (MCSORLEY e GARSIDE, 1999). De fato, tem sido mostrado que tal estratégia de tolerização, usando esplenócitos acoplados a antígenos, ligantes de peptídeos alterados (APL) ou LACK conjugado à subunidade B da toxina do cólera (CTB), atenua o desenvolvimento das lesões ou

confere a capacidade de resistir totalmente à infecção por *Leishmania* (SOLDERA *et al.*, 1997; MCSORLEY *et al.*, 1998; PINGEL *et al.*, 1999).

Estratégias semelhantes têm sido empregadas experimentalmente na vacinação contra doenças alérgicas também mediadas por respostas com fenótipo Th2 (TAKAGI *et al.*, 2005).

1.9 Plantas como Bioreatores

A biotecnologia vegetal é uma importante ferramenta no desenvolvimento de produtos agrícolas, mas também tem sido utilizada para produzir proteínas heterólogas de aplicações terapêuticas, científicas e industriais. Assim, tem crescido o número de plantas transgênicas que expressam anticorpos, biofármacos e antígenos (GIDDINGS *et al.*, 2000; ABRANCHES *et al.*, 2005).

Os anticorpos são essenciais para o diagnóstico e tratamento de doenças, além de sua vasta aplicação científica e industrial (GIDDINGS *et al.*, 2000). Há inúmeros exemplos de anticorpos recombinantes produzidos em plantas e facilmente estocados em folhas secas, sementes ou tubérculos, demonstrando um grande potencial para estocagem a longo prazo. Já foi descrita a produção de anticorpos estruturalmente corretos para utilização em imunodiagnósticos e para outros fins (GIDDINGS , 2001; HIATT *et al.*, 1989).

As plantas transgênicas possuem um alto potencial para uma produção de proteínas recombinantes apresentando inúmeras vantagens:

- As plantas crescem facilmente com baixo custo e em grandes quantidades;

- Utilização da infra-estrutura agrônômica disponível para a colheita, processamento e estocagem;
- No caso da produção de proteínas recombinantes em sementes, não há necessidade de refrigeração durante o transporte e estocagem;
- As plantas hospedam pouquíssimos patógenos humanos, aumentando assim a segurança dos produtos produzidos;
- Capacidade de realizar modificações pós-transcricionais como splicing, e pós-traducionais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto;
- A purificação não é necessária no caso da produção de vacinas comestíveis;
- Produção direcionada para órgãos de interesse como sementes ou folhas (ABRANCHES *et al.*, 2005; PANAHI *et al.*, 2004; GIDDINGS, 2001; DE WILD *et al.*, 2000; GIDDINGS *et al.*, 2000).

Comparando a produção de proteínas recombinantes em sistemas transgênicos, foi mostrado que o custo de produção em plantas pode ser três ordens de magnitude menor do que o da produção em culturas de células de mamíferos ou até dez vezes menor do que a fermentação microbiana (HOOD e WOODARD, 2002).

A utilização de plantas transgênicas como biorreatores apresenta alguns desafios. A purificação da proteína recombinante é um passo potencialmente

custoso. No entanto, vários métodos têm sido desenvolvidos para solucionar este problema incluindo a produção direcionada para o endosperma de sementes de onde as proteínas recombinantes podem ser extraídas com maior facilidade. (GODDIJN e PEN, 1995; GIDDINGS, 2001; ABRANCHES *et al.*, 2005).

Baixos níveis de expressão da proteína recombinante dificultam uma possível utilização comercial deste produto. Este problema pode ser contornado através da utilização de promotores fortes e constitutivos, seqüências intensificadoras de transcrição (*enhancers*), peptídeos sinais para retenção no retículo endoplasmático e otimização dos códons preferenciais do hospedeiro (PANAHI *et al.*, 2004).

1.10 – Vacinas Comestíveis

Nos últimos anos, plantas têm sido transformadas com genes codificando subunidades antigênicas de patógenos objetivando a produção de vacinas contra doenças humanas e animais. Uma abordagem inovadora sobre a produção de vacinas em plantas foi dada por Charles Arntzen no início dos anos 90 quando introduziu o conceito de vacinas comestíveis. Segundo esta idéia, plantas comestíveis transgênicas que expressem antígenos, poderiam ser administradas oralmente desencadeando uma resposta imune protetora (MASON *et al.*, 1992). Através deste método produzir-se-iam vacinas mais baratas, seguras, facilmente administradas e acessíveis em todas as partes do mundo. A partir dessa idéia, diversos grupos vêm utilizando esta estratégia objetivando a produção de vacinas. Testes clínicos conduzidos pela indústria biofarmacêutica ProdiGene demonstraram que porcos ao serem alimentados com uma vacina comestível

produzida em milho, ficaram protegidos contra o vírus da gastroenterite (TGEV). Esta empresa patenteou esta e outras vacinas humanas e animais (GIDDINGS *et al.*, 2000). Em 2006, o trabalho realizado por Wen e colaboradores mostrou que a administração oral de tabaco transgênico foi capaz de proteger camundongos dos efeitos da toxina Shiga tipo II (WEN *et al.*, 2006). Em 2007, Golovkin e colaboradores observaram proteção em camundongos contra o vírus da varíola após a administração nasal e parenteral de um antígeno viral produzido em tabaco transgênico (GOLOVKIN *et al.*, 2007). Testes clínicos realizados pelo grupo pelo grupo do Dr. Hugh Mason mostraram que o antígeno HbSAg do vírus da hepatite B produzido em batata e administrado oralmente foi capaz de aumentar os níveis de anticorpos específicos em voluntários humanos (THANAVALA *et al.*, 2005).

Uma grande vantagem da utilização de vacinas comestíveis é que pode não ser necessária a purificação da proteína recombinante, diminuindo acentuadamente o custo das vacinas. Porém a concentração da proteína recombinante deve ser padronizada para que cada dose possua a mesma concentração da proteína recombinante. Assim, poderia se fazer extratos das plantas transgênicas, padronizando as concentrações das proteínas recombinantes (DE WILD *et al.*, 2000).

1.11 – Tabaco como Biorreator

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tem sido utilizado como biorreator devido à facilidade de cultivo *in vitro* e alta receptividade à transformação genética. Várias proteínas recombinantes já foram expressas em tabaco, como o HBsAg (do vírus da hepatite B), o epítipo de célula B da malária, a hemaglutinina do vírus

influenza, além da proteína c-Myc (destinada ao tratamento contra o câncer) (HIATT, *et al.*, 1989; TACKET e MASON, 1999 ; MA *et al.*, 2003; ABRANCHES *et al.*, 2005, WEN *et al.*, 2006) .

Apesar de não ser uma planta comestível, os estudos em tabaco contribuem para um melhor planejamento em plantas comestíveis. Além disso, em termos de biossegurança, tem a vantagem de não ser ingerido acidentalmente por humanos.

Desta forma, tomando-se como base:

1 - a eficácia oral da vacina bruta de *Leishmania amazonensis* (LaAg) na proteção contra a leishmaniose cutânea (PINTO *et al.*, 2003)

2 - a eficácia de uma vacina nasal de DNA codificando um componente do LaAg, a proteína LACK de *Leishmania infantum*, contra a leishmaniose cutânea (PINTO *et al.*, 2004) e visceral (GOMES *et al.*, 2007)

3 - a disponibilidade dos plasmídeos de expressão vegetal codificadores do gene LACK (RIBEIRO, 2000; SILVA, 2000) de *Leishmania chagasi*.

Propomos neste trabalho o desenvolvimento de uma vacina comestível contra a leishmaniose cutânea.

1.12 - Plasmídeos

Foram utilizados neste trabalho dois plasmídeos de expressão em plantas codificando o gene LACK de *Leishmania* construídos no Laboratório de Biotecnologia – UENF. Os plasmídeos recombinantes p35LACK e p35LACKER contém o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor que controla a transcrição dos genes *LACK* e *LACKER*, a seqüência líder não traduzida Ω do

vírus do mosaico do tabaco que intensifica a transcrição (SILVA, 2000; ABRANCHES *et al.*, 2005), a seqüência codificadora do gene *LACK* de *L. chagasi* (p35LACK) (PIZZELI, 1998) ou a seqüência codificadora do gene *LACK* ligada à seqüência codificadora do sinal de retenção no retículo endoplasmático SEKDEL (p35LACKER) (Prof. Ekkehard Hansen-UENF, comunicação pessoal), e o sinal de poliadenilação do vírus do mosaico da couve-flor (linhagem Cabb B-D). Este gene quimérico foi isolado do plasmídeo e clonado no vetor de expressão em plantas pGPTV-KAN-Asc formando os plasmídeos pGLACK (RIBEIRO, 2000) e pGLACKER (SILVA, 2000), respectivamente. O vetor pGPTV-KAN-Asc possui as seqüências das bordas direita e esquerda do T-DNA (DNA de transferência) do plasmídeo Ti (de *Tumor-inducing*) de *Agrobacterium tumefaciens* responsáveis pela integração no genoma vegetal, a seqüência codificadora do gene da β -glucuronidase (*uid A*), promotor da nopalina sintase (Pnos) que promove a transcrição da seqüência codificadora do gene da neomicina fosfotransferase II (*nptII*) e a seqüência terminadora da transcrição (pAg7) (RIBEIRO, 2000) (Fig. 3). Os plasmídeos pGLACK e pGLACKER foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* (SILVA, 2000; RIBEIRO, 2000) através de conjugação triparental (WALKERPEACH e VELTEN, 1994).

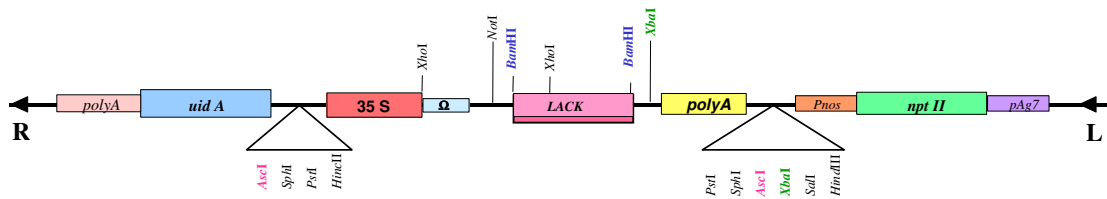


Fig. 3 – Plasmídeo pGLACK e pGLACKER: seqüências das bordas direita (**R**) e esquerda (**L**) do T-DNA. **uid A**: seqüência codificadora do gene da β -glucuronidase. **Pnos**: promotor da nopalina sintase. **nptII**: seqüência codificadora do gene da neomicina fosfotransferase II. **pAg7**: seqüência terminadora da transcrição. **35S**: promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. **Ω** : seqüência líder não traduzida Ω do vírus do mosaico do tabaco. **LACK**: seqüência codificadora do gene *LACK* de *L. chagasi*. **LACKER**: seqüência codificadora do gene *LACK* ligada à seqüência codificadora do sinal de retenção no retículo endoplasmático SEKDEL. **polyA**: sinal de poliadenilação do vírus do mosaico da couve-flor. Este plasmídeo também possui sítio de restrição para diversas enzimas.

2. Objetivos

2 – Objetivo Geral

Este trabalho visa a expressão do antígeno LACK de *Leishmania chagasi* em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e avaliação de sua eficácia na vacinação contra a leishmaniose cutânea em camundongos.

2.1 Objetivos Específicos

- Transformação de plantas de tabaco com o gene LACK de *L. chagasi*;
- Avaliação da presença do transgene via PCR;
- Avaliação da expressão do transgene;
- Avaliação da imunogenicidade e eficácia da vacina oral contra a infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis*.

3. Material e Métodos

3.1 - Desinfecção e germinação de sementes de tabaco

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L., cultivar “Petite Havana SR1”) foram desinfectadas primeiramente por imersão em solução de etanol a 70 % durante 30 segundos. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada estéril e então imersas em solução a 10 % (v/v) de água sanitária contendo 2 a 2,5 % de cloro ativo durante 30 minutos. Após este período as sementes foram finalmente lavadas em água destilada estéril. A semeadura foi realizada sob condições assépticas em potes apropriados contendo 50 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sólido. A germinação ocorreu sob um fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 °C.

3.2 - Micropropagação de plantas de tabaco

A cada 15 dias, em média, foi realizado um subcultivo de plantas de tabaco: fragmentos caulinares contendo pelo menos uma folha foram excisados e transferidos para um pote contendo 50 mL de meio MS sólido.

3.3 - Transformação de tecido foliar de tabaco

Em ambiente estéril, folhas de tabaco foram excisadas com o auxílio de um bisturi e transferidas para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cocultura (meio MS líquido) com o auxílio de uma pinça. Em seguida, as folhas tiveram a nervura central retirada e então cortadas em pequenos fragmentos, os quais foram utilizados como explantes para a infecção pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* que transfere e integra de forma aleatória para o genoma vegetal parte do plasmídeo Ti (onde foi colocado o gene LACK). Os

explantes foram então transferidos para placas de Petri contendo 10 mL de meio de cocultura e 25 µL de cultura de *A. tumefaciens* (contendo os plasmídios recombinantes pGLACK ou pGLACKER) previamente crescida em meio YEB líquido acrescido de rifampicina e canamicina (ambos na concentração final de 100 µg/mL) sob agitação constante durante 36 h a 28 °C.

Após dois dias de incubação no meio acima a 25 °C e sob ausência de luz, os explantes foram lavados em meio de cocultura, passados em papel filtro estéril para retirar o excesso de bactéria e transferidos para placas de Petri contendo meio para indução de calejamento [meio MS sólido contendo os reguladores de crescimento IAA (ácido 3-indolacético) e BAP (6-benzilaminopurina) na concentração final de 2,0 µg/mL e 0,2 µg/mL, respectivamente] acrescido dos antibióticos canamicina e cefotaxima (concentração final de 100 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente), sendo o primeiro para selecionar os tecidos transformados e o segundo, para eliminar a *Agrobacterium*.

Os calos formados foram transferidos para potes contendo 50 mL de meio de brotamento (meio MS sólido contendo os reguladores de crescimento IAA e BAP na concentração final de 0,2 µg/mL e 2,0 µg/mL, respectivamente) acrescido de cefotaxima (Sigma – estoque diluído em água e filtrado) e canamicina (concentração final de 250 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente).

Os brotos formados foram então excisados dos calos e transferidos para potes contendo 50 mL de meio de enraizamento (meio MS sólido sem reguladores de crescimento) acrescido de cefotaxima e canamicina (concentração final de 250 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente). Os brotos enraizados foram então micropropagados como descrito no item 3.4.

3.4 – Confirmação da presença do transgene por PCR

A presença do transgene nas plantas enraizadas em meio contendo canamicina foi avaliada através do método de PCR. O DNA de folhas destas plantas foi extraído com a utilização do kit Biogreen DNA Purification (Biotools). Em seguida, o marcador 250pb ladder (Promega) e alíquotas do DNA extraído foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1 X [estoque 50X – 242g de Tris base, 57,1mL de ácido acético glacial, 10mL de EDTA 0,5M pH 8,0, água destilada q.s.p. 1L]; agarose 1 %; brometo de etídio 0,05 %).

Nas reações foram utilizados 60 ng de DNA molde (extraído das folhas). As concentrações dos demais componentes foram 50 pmoles de cada iniciador, tampão da Taq DNA polimerase 1 X concentrado, MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0,2 mM, 2,5 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura para um volume final de 50 µL. As temperaturas e os tempos utilizados foram:

Desnaturação inicial:	94 °C – 5 minutos	
Desnaturação:	94 °C – 1 minuto	} 35 ciclos
Anelamento:	55 °C – 1 minuto	
Extensão:	72 °C – 1 minuto	
Extensão final:	72 °C – 5 minutos	

Para as bactérias transformadas com o plasmídio pGLACK, os iniciadores utilizados foram: P5LACK (*upstream*) (5' – CGG GCA GCG GGA TCC ATA TGA ACT ACG AGG GTC ACC TGA AG – 3') e P3LACK (*downstream*) (5' – CGG ACC ACG GGA

TCC TTA CTC GGC GTC GGA GAT GGA CCA CA – 3'), específicos para as extremidades da seqüência codificadora do gene *LACK*. Para as bactérias transformadas com o plasmídio pGLACKER, os iniciadores utilizados foram: P5LACK (*upstream*) e PLACK3ER (*downstream*) (5' – ACC ACG GGA TCC TCA TAG CTC ATC TTT CTC AGA CTC GGC GTC GGA GAT GGA CCA CA – 3'), específicos para as extremidades da seqüência *LACKER*.

3.5 - Extração de Proteínas

Para a extração das proteínas totais das plantas transgênicas, as folhas recém-coletadas foram inicialmente maceradas em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó, e liofilizadas. Foi adicionado 1mL de tampão de extração (5 mL de PBS 10X, EDTA 0,5M, 1g de Ascorbato de sódio, 20uL de Triton X-100 e água ultrapura q.s.p. 50mL) de proteínas a cada 50 mg de pó. Essas amostras foram submetidas à agitação por 1 hora a uma temperatura de 4 °C. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 10000 g a uma temperatura de 10 °C. O sobrenadante foi estocado a -20 °C (Adaptado de SILVA, 2003)

3.6 – Avaliação da expressão da proteína LACK por Dot blot

A expressão do transgene em nível de proteína nas plantas transgênicas foi verificada através da técnica de dot blot. O extrato protéico (item 3.7) foi descongelado a 4 °C e 20 µL das amostras (aproximadamente 1,25 mg do tecido foliar seco) foram diluídas em 80 µL de tampão de extração e aplicadas em uma membrana de nitrocelulose (Immobilon - NC – Millipore) sob vácuo através da

utilização do aparelho de dot blot (Bio-Rad). Após a aplicação a membrana foi deixada à temperatura ambiente por 16 horas para inativação das peroxidases. A membrana foi incubada por uma hora em tampão de bloqueio (5g de leite em pó diluídos em 100mL de PBS) e submetida a 4 lavagens de dez minutos com PBS. A membrana foi em seguida incubada com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-LACK, cedido pelo Dr. Nicolas Glaichenhaus) diluído em tampão de bloqueio (1:500) durante uma hora e meia sob agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas quatro vezes por dez minutos cada e então incubadas com o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase, fornecido no kit ECL Western Blotting Analysis System – Amersham Biosciences) diluído em tampão de bloqueio (1:3000) durante duas horas a temperatura ambiente. Finalmente, a membrana foi lavada quatro vezes por dez minutos cada.

Os anticorpos ligados foram então detectados com o reagente ECL. Em seguida, um filme de raio-X (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Life Science) foi exposto às membranas durante 1 minuto e meio e então revelado com a utilização de fixador e revelador Kodak GBX, segundo instruções do fabricante. Utilizamos como controle positivo a proteína LACK recombinante purificada cedida pelo Dr. Nicolas Glaichenhaus do Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Institut Universitaire de France, Valbonne, França.

3.7 – Análise Densitométrica

Para estimarmos a expressão da proteína LACK nas plantas transgênicas a partir dos resultados do dot blot, utilizamos o programa computacional de densitometria "Gel Perfect" (BOZZO e RETAMAL, 1991). A expressão da proteína recombinante foi quantificada a partir da comparação da quantidade de pixels da amostra com o controle (onde foi aplicada uma quantidade conhecida da proteína). Após isso, por regra de três encontramos a porcentagem de proteína recombinante no peso da folha seca (liofilizada) e no total de proteínas solúveis (TSP).

3.8 – Aclimação das plantas no solo

Plantas transgênicas, cuja expressão da proteína recombinante LACK foi confirmada, e plantas selvagens foram transferidas para o solo em uma casa de vegetação com temperatura de 26 °C. Para isto, as plantas foram retiradas do ambiente estéril e tiveram suas raízes cuidadosamente lavadas para retirada do excesso de meio de cultura, sendo então transferidas para um vaso contendo terra. Nos primeiros dias de aclimação, foi colocada ao redor da planta uma cobertura de filme PVC para evitar o excesso de perda de água.

3.9 – Preparo das folhas para vacinação

Folhas novas (com até um mês) recém-coletadas de plantas transgênicas ou selvagens foram maceradas, em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de

um fino pó, e liofilizadas. O pó liofilizado foi ressuspensionado em PBS numa concentração de 50mg/mL.

3.10– Parasitos

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em cultura a 26 °C em meio de cultura D-MEM (Sigma Chemical Co) suplementado com 50U/mL de penicilina (Cultilab), 50µg/mL de estreptomicina (Cultilab), 20 mM de HEPES (Sigma Chemical Co.) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFBI,Cultilab). Para garantir a infectividade, os parasitos foram usados no máximo até a quarta passagem quando então eram re-isolados por punção de lesões de camundongos BALB/c experimentalmente infectados. (PINTO *et al.*,2003)

3.11 – Preparação do antígeno LaAg

Promastigotas de *L. amazonensis* no início da fase estacionária de crescimento foram lavados três vezes por centrifugação a 1300g por 10 min com PBS. O “pellet” foi ressuspensionado a 2×10^8 promastigotas/mL de PBS e submetido a 10 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. O lisado obtido foi denominado LaAg e estocado a -20 °C até o uso. A dosagem de proteínas pelo método de Lowry mostrou que 1mL de LaAg continha 1 mg de proteínas totais. A curva padrão foi feita com Albumina sérica bovina (BSA). (PINTO *et al.*, 2003).

3.12 – Camundongos

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram mantidos com água e maravalha autoclavadas e ração comercial durante todo o experimento e mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho), e utilizados com idade entre 4 e 6 semanas. Em todos os experimentos realizados, utilizamos 5 camundongos por grupo. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os “Princípios Básicos para a Pesquisa Envolvendo o Uso de Animais” e foi aprovado e registrado sob o número 17 pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP- IBCCF / UFRJ).

3.13 – Imunização

Camundongos BALB/c em jejum de no mínimo 3 horas, foram levemente anestesiados por inalação de éter e receberam pela via oral (gavagem intragastrica) 4 doses de 10mg cada do liofilizado de folhas das planta transgênicas ou selvagens ressuspendidas em 200µL de PBS em intervalos de 3-4 dias (total de 40mg = 76µg de LACK). O LaAg foi administrado por via oral em 2 doses de 100µg com intervalo de 7 dias entre as doses.

3.14 – Infecção

Uma semana após a última dose da vacina, os animais foram infectados no coxim plantar da pata traseira direita, com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* em um volume final de 20 µL de PBS. O curso da lesão foi

acompanhado pela medida da lesão com um paquímetro (Mitutoyo, Brasil – 0 a 9,9mm) a cada 4-5 dias. O tamanho das lesões foi calculado pela diferença entre espessura das patas infectadas e a espessura das mesmas patas antes da infecção. Ao final do experimento, a carga parasitária das lesões foi determinada conforme abaixo (PINTO *et al.*, 2003).

3.15 – Determinação da carga parasitária

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados (inalação de éter) e as patas infectadas cortadas na articulação com a tíbia, tiveram a pele removida, foram trituradas e homogeneizadas individualmente em 1ml de meio D-MEM (Cultilab, Brasil) contendo 10% de SFBI. Ensaio de diluição limitante (LDA) foi realizado como descrito previamente (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). Resumidamente, alíquotas duplicadas de 200 µL da suspensão de células foram diluídas seriadamente a 1:4 em placas de 96 poços (Nalgene Nunc-USA) em D-MEM contendo 10% de SFBI, por 12 diluições. As células foram incubadas em estufa a 27°C por 10 dias. Ao final, foi calculado o número de *Leishmanias* por pata, tomando-se como referência a última diluição em que se verificou a presença de promastigotas ao microscópio.

3.16 – Reação de hipersensibilidade cutânea de Jones-Mote

A reação de hipersensibilidade foi medida em duas situações diferentes:

1) Para avaliar a imunogenicidade da vacina (PINTO *et al.*, 2003), sete dias após a última dose da vacina os camundongos foram infectados com 2×10^6 L.

amazonensis e a espessura da pata infectada foi medida com um paquímetro nos tempos indicados e expressa como a diferença entre as espessuras antes e depois da infecção.

2) Para avaliar a resposta durante a infecção (PINTO *et al.*, 2003), camundongos imunizados ou não pela via oral foram infectados com 2×10^6 *L. amazonensis*. Sete dias depois, foi inoculado 20µg de LaAg em 20µL de PBS na pata contralateral. A espessura da pata foi medida e expressa como acima.

3.17 – Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo método Anova. Os resultados descritos como significativamente diferentes tiveram $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1-Transformação do tabaco

Cerca de 320 explantes foliares de tabaco foram cocultivados com *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo recombinante pGLACK (160 explantes) ou pGLACKER (160 explantes). Desses, nove explantes formaram calos (induzidos pelo meio de calejamento) indicando a infecção por *A. tumefaciens* (já que esse meio é seletivo), sendo oito transformados com o plasmídeo pGLACKER e um com o plasmídeo pGLACK. Após a passagem dos calos para o meio de brotamento observou-se a formação de brotos após 30 dias, em média. Os brotos formados foram transplantados para meio de enraizamento onde verificou-se a formação de raízes após uma semana (Fig 4).



Fig. 4 - Planta de tabaco transgênica em meio de enraizamento com canamicina.

4.2 – Análise das plantas transformadas por PCR

As plantas regeneradas foram analisadas por PCR para confirmação da presença do transgene. A amplificação de um fragmento de 1 Kb, conforme mostra a Fig. 5, confirma a presença do gene *LACK* nas plantas transformadas com pG LACKER (linhas 5 a 12) ou naquela transformada pGLACK (linha 13).

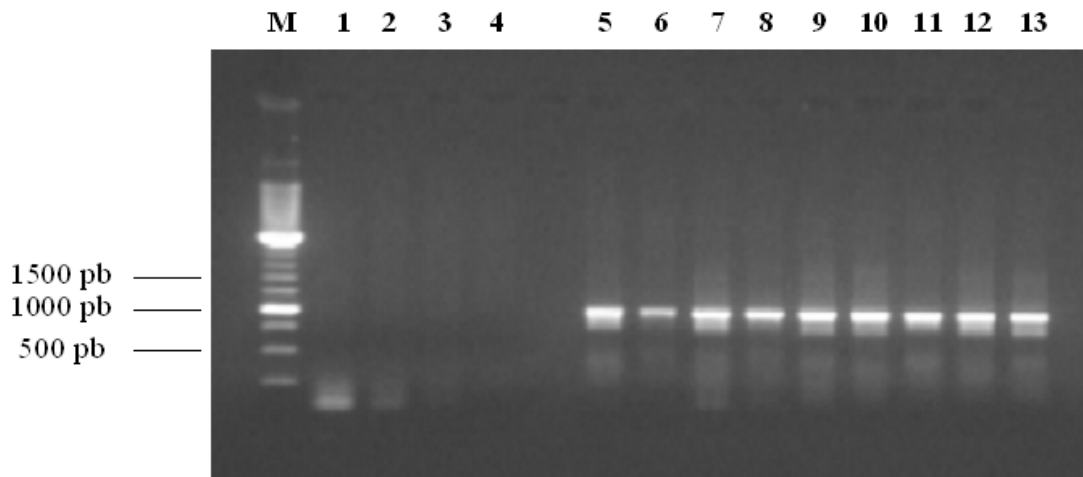


Fig. 5 – Verificação por PCR da presença do transgene pGLACK ou pGLACKER em plantas de tabaco. M: marcador 250bp ladder; 1: controle negativo sem DNA; 2-4: controle negativo com DNA de plantas não transformadas; 5-12: DNA de plantas transformadas com o pGLACKER; 13:DNA de planta transformada com o pGLACK.

4.3 – Análise da expressão do transgene

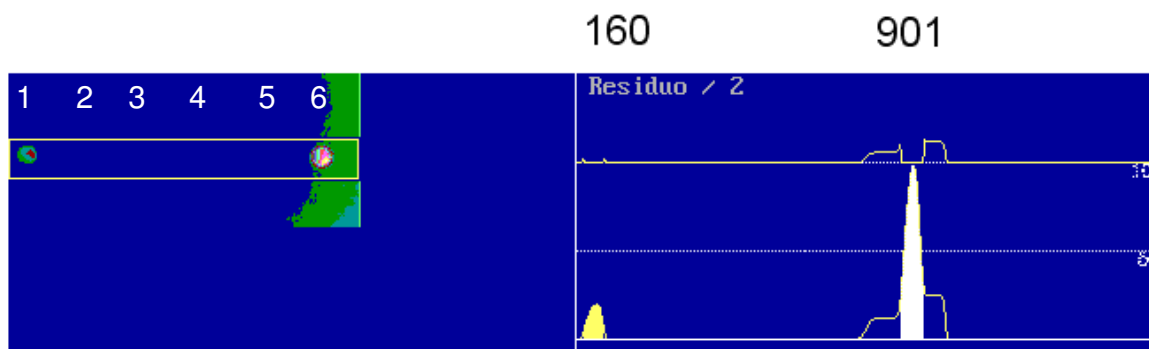
A expressão do transgene em nível de proteína foi confirmada através da técnica de dot blot. Das 9 plantas transgênicas obtidas, foi confirmada a expressão

da proteína LACK em uma única planta transformada com o plasmídeo pGLACKER (planta denominada TLER010106, linha 5 da Fig. 5). A Fig. 6 mostra a análise de 4 plantas transformadas, representativa de 5 experimentos. Nesta, estimou-se através da utilização do programa computacional de densitometria “gel perfect” (BOZZO e RETAMAL, 1991), a expressão da proteína LACK numa concentração de aproximadamente 0,18% do total do tecido foliar (peso seco) (Fig. 7A).



Fig. 6 – Análise da expressão da proteína LACK em plantas de tabaco transgênico.
Dot 1: Extrato proteico de 1,25 mg (peso seco) de tecido foliar da linhagem transgênica TLER010106 que foi transformada com o plasmídeo pGLACKER;
Dot 2-4: Extrato proteico de 1,25 mg (peso seco) de tecido foliar de outras linhagens transgênicas que não expressaram a proteína LACK; 5: Extrato proteico de 1,25 mg (peso seco) de tecido foliar de plantas de tabaco não transformadas (controle negativo); Dot 6: 13µg da proteína LACK purificada (controle positivo).

A



B

	Intensidade (Pixels)	Quantidade de LACK	Quantidade relativa de LACK (peso seco)	Quantidade relativa de LACK (TSP)
Extrato Proteico Planta Transgênica (Dot 1)	160	2,3 ug	0,18%	6%
Proteína LACK purificada (Dot 6)	901	13 ug	0	0

Fig. 7A – Análise computacional mostrando a intensidade das marcações obtidas por Dot blot.

À esquerda: representação da área escaneada da Fig. 6. À direita: Gráfico representando a intensidade das amostras. A área amarela representa a intensidade da expressão de LACK da linhagem transgênica TLER010106 (dot 1). A área branca representa a intensidade da marcação de 13ug da proteína controle (LACK recombinante, dot 6). 2-4 : Extrato proteico de plantas transgênicas que não expressaram a proteína LACK em quantidades detectáveis. 5 : Extrato proteico de uma planta selvagem. **Fig. 7B** – Tabela representativa da Fig, 7A, relacionando os valores em pixels com a concentração e porcentagem de LACK.

4.4 – Efeito da vacinação com a planta transgênica LACK+ na hipersensibilidade cutânea a antígenos de *Leishmania*

Nos estudos anteriores de vacinação oral com LaAg, foi observado que os animais vacinados e parcialmente protegidos contra a infecção com *L. amazonensis* desenvolviam uma reação cutânea Jones Mote de menor intensidade quando desafiados por via subcutânea com o mesmo antígeno (PINTO *et al.*, 2003). Para avaliar o efeito da vacinação oral com o liofilizado de folhas da planta transgênica TLRO10106 LACK+ na reação de Jones Mote, camundongos BALB/c foram imunizados pela via oral com 2 doses de 10 mg da planta transgênica ou, para fins comparativos, com as mesmas 2 doses de 100 µg de LaAg usadas anteriormente no trabalho de Pinto e colaboradores em 2003. Camundongos controles receberam 2 doses de PBS ou da planta selvagem. Uma semana após a segunda dose, os animais foram infectados com *L. amazonensis* e a resposta local aos parasitos vivos foi avaliada pelo inchaço da pata infectada por até 72 horas. Conforme mostra a Figura 8A, a infecção por si só induziu um inchaço local no grupo não vacinado (PBS) que regrediu progressivamente após 20 horas. Nenhum outro grupo reagiu com inchaço maior que o grupo não vacinado, indicando ausência de sensibilização ativa detectável. Apesar de haver tendência a um menor inchaço nos animais vacinados com a planta transgênica, esta não se revelou estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Quando os animais foram desafiados após 7 dias de infecção com o antígeno LaAg na pata contralateral, uma resposta mais intensa foi verificada. Enquanto o inchaço produzido após 18 horas de infecção no grupo PBS era de apenas $22 \text{ mm} \times 10^{-2}$

(Fig. 8A), este foi de $54 \text{ mm} \times 10^{-2}$ no mesmo grupo desafiado com LaAg (Fig. 8B), compatível com a sensibilização induzida pela infecção ativa. A reatividade cutânea observada na Figura 8B mostrou-se tipicamente de Jones Mote, com pico máximo em torno de 15-18 horas, indicativo de prognóstico desfavorável, em contraposição à reação clássica de hipersensibilidade cutânea tardia (DTH) mediada por resposta Th1 que tem pico de inchaço em 48 horas, a qual é normalmente relacionada a um prognóstico favorável na leishmaniose cutânea murina causada por *L. major*. A menor resposta de Jones-Mote no grupo vacinado com LaAg está de acordo com o observado anteriormente (PINTO *et al.*, 2003). Vale destacar que a resposta de Jones-Mote foi ainda mais reduzida no grupo que recebeu a planta transgênica. Este efeito foi muito provavelmente devido ao antígeno LACK produzido pela planta, uma vez que a administração oral da planta selvagem não afetou a resposta. Esses resultados indicam que a vacinação oral com o tabaco transgênico expressando o antígeno LACK previne a resposta de Jones-Mote *Leishmania*-específica de forma semelhante ao observado com a vacina LaAg(Fig. 8B).

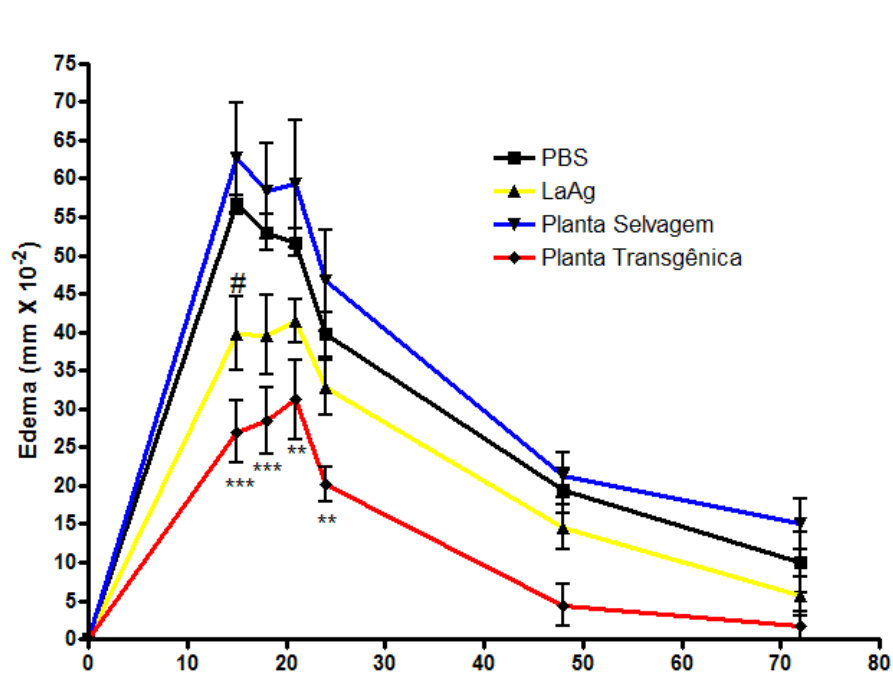
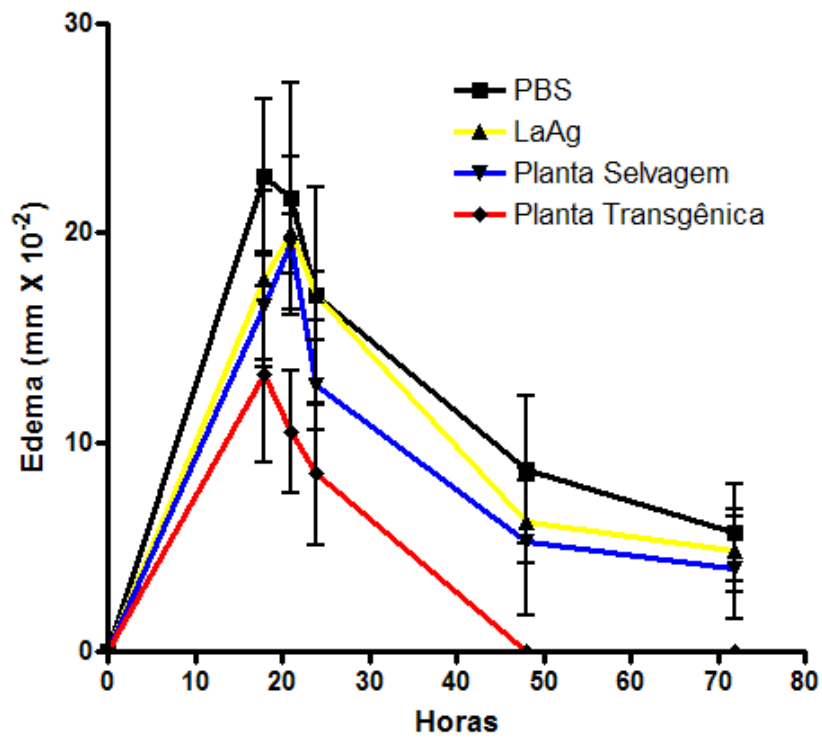


Fig. 8. Reação de hipersensibilidade cutânea. Camundongos BALB/c foram vacinados por via oral com 2 doses de 20 mg da planta transgênica ou de 100 µg de LaAg. Controles receberam 2

doses de 20 mg da planta selvagem ou 200uL de PBS. Uma semana após a última imunização os animais foram infectados com *L. amazonensis* na pata e o inchaço produzido foi acompanhado por até 72h (A). Sete dias após a infecção, os animais foram desafiados com 20mg de LaAg na pata contra lateral e o inchaço destas patas acompanhado da mesma forma (B). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. # $p < 0,05$ em relação ao PBS. Foram utilizados 5 animais por grupo.

4.5 – Eficácia da vacinação com a planta transgênica LACK + no controle da infecção com *L. amazonensis*.

Uma vez demonstrado que a vacinação oral com a planta transgênica interfere na resposta imune ao parasito aparentemente de forma favorável ao hospedeiro (Fig 8), avaliamos aqui o efeito da vacinação no controle da infecção. Desta forma, foi realizado um novo experimento onde animais foram vacinados e infectados como anteriormente, e o crescimento das lesões foi acompanhado por 3 meses. Conforme mostram as Figuras 9 e 10, os camundongos que receberam a planta transgênica LACK+ apresentaram um crescimento significativamente mais lento ($p < 0,001$) no tamanho da lesão e numa menor carga parasitária. A vacinação com a planta selvagem não afetou o crescimento da lesão, porém, a carga parasitária neste grupo foi significativamente menor que a do grupo PBS. Apesar de não ter sido tão pronunciado como a planta transgênica, o grupo que recebeu LaAg teve também um desenvolvimento da lesão mais lento e também uma menor carga parasitária em relação ao PBS. Esses resultados indicam que o efeito imunomodulador da vacina oral com a planta transgênica se reflete em proteção mesmo que parcial contra a infecção por *L. amazonensis*, mostrando-se ainda mais eficaz que o LaAg.

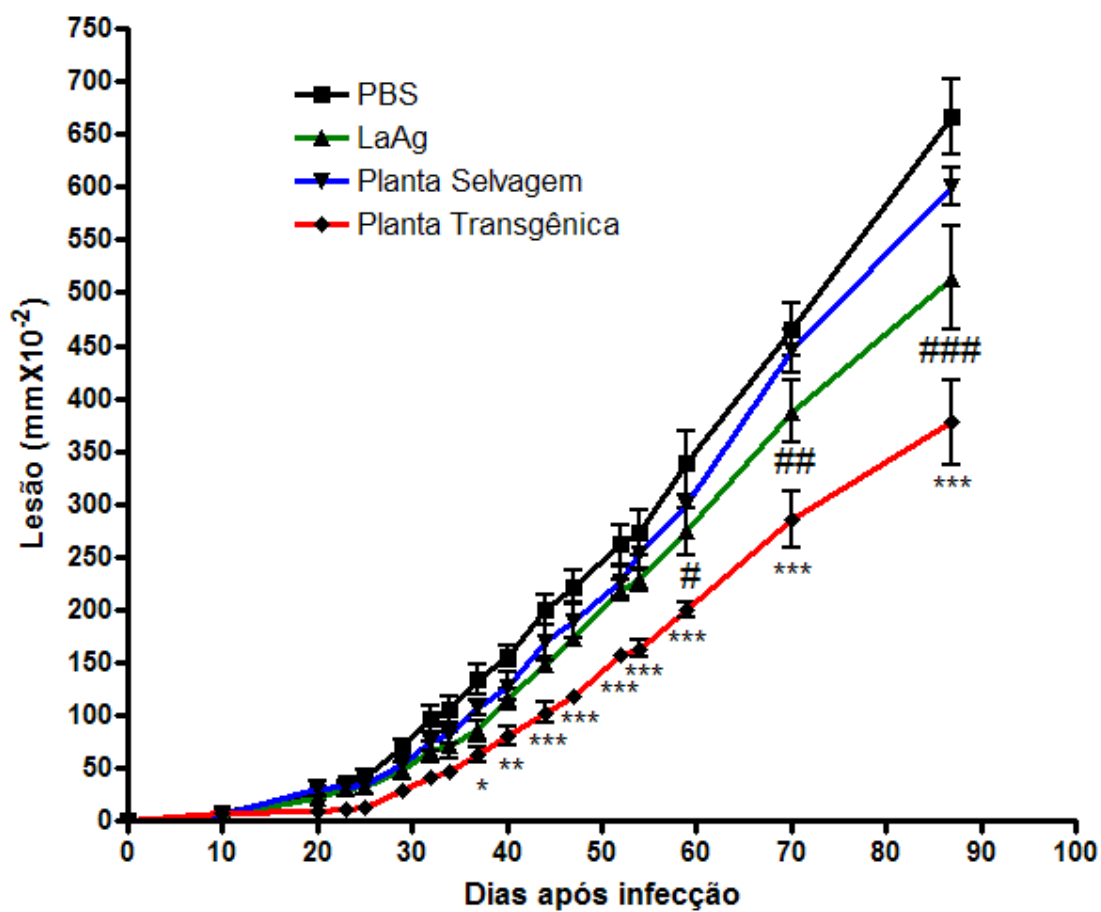


Fig. 9 – Eficácia da vacinação no crescimento da lesão. Camundongos BALB/c foram vacinados com 2 doses de 20 mg da planta transgênica ou de 100 µg de LaAg. Controles receberam 2 doses de 20 mg da planta selvagem ou PBS. Uma semana após a última imunização, os animais foram infectados com *L. amazonensis* na pata e a lesão medida até o dia 88. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo que recebeu PBS.

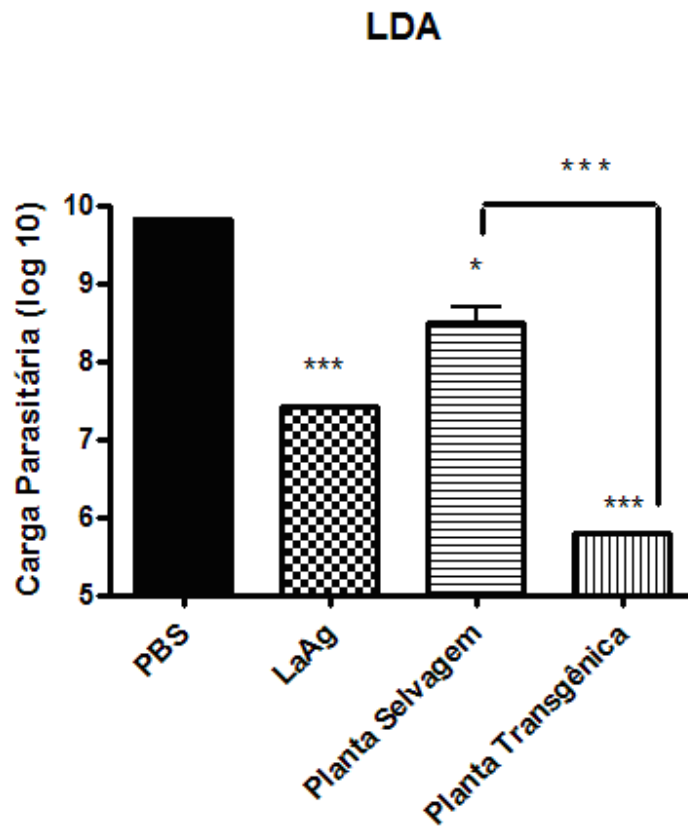


Fig. 10 – Diminuição da carga parasitária após vacinação oral com o tabaco transgênico expressando LACK. Camundongos BALB/c foram imunizados com 2 doses de 20 mg da planta transgênica ou de 100 µg de LaAg. Controles receberam 2 doses de 20 mg da planta selvagem ou PBS. Uma semana após a última imunização, os animais foram infectados com *L. amazonensis* na pata e sacrificados no dia 88 de infecção. Carga parasitária foi medida pelo ensaio de diluição limitante (LDA). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu PBS.

5. Discussão

5 – Discussão

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir com novas estratégias de vacinação contra a leishmaniose. A eficácia de uma vacina oral contra a leishmaniose cutânea foi demonstrada por nosso grupo administrando-se oralmente um extrato de antígenos totais de *L. amazonensis* (LaAg) a camundongos (PINTO *et al.*, 2004). Dentre os vários candidatos em potencial que compõem o LaAg, escolhemos para ser utilizado neste trabalho o antígeno LACK, descrito como um fator de virulência do parasito capaz de expandir rapidamente a resposta imune para um fenótipo Th2, conferindo maior susceptibilidade à infecção cutânea por *Leishmania major* e na infecção visceral por *L. donovani* (MCSORLEY e GARSIDE, 1999, KELLY *et al.*, 2003).

O antígeno LACK tem sido utilizado na pesquisa de vacinas contra leishmaniose, com resultados controversos quando utilizado na forma protéica por via parenteral (GURUNATHAN *et al.*, 1997; GONZALO *et al.*, 2001). Por outro lado, quando a vacina é testada na forma de DNA codificando o gene *LACK*, conferiu proteção significativa tanto por via intramuscular (GONZALO *et al.*, 2002; RAMIRO *et al.*, 2003; TAPIA *et al.*, 2003) como nasal (PINTO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2007). Tentativas anteriores de utilizar a proteína LACK recombinante produzida em *E. coli* para induzir proteção em camundongos BALB/c contra a infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* por via nasal não tiveram sucesso (PINTO *et al.*, 2004). Essa falha pode ter sido devida à degradação enzimática da proteína livre no ambiente da mucosa, antes de sua captação por APCs locais.

No intuito de produzir a proteína vacinal com possíveis modificações pós-traducionais (mantendo, assim, forma semelhante a original) e ao mesmo tempo diminuir os custos de produção, utilizamos neste trabalho plantas como bioreatores. Esta estratégia de produção de proteínas recombinantes tem recebido cada vez mais atenção, já tendo atualmente produtos comercializados no mercado, como o anticoagulante hirudin (GIDDINGS *et al.*, 2000). Neste sentido, a utilização de plantas transgênicas expressando antígenos para produção de vacinas é também uma abordagem promissora e inovadora. Diversos trabalhos descrevem a utilização de plantas transgênicas para a produção de antígenos. Lee e colaboradores em 2001, produziram em tabaco uma toxina da bactéria *Mannheimia haemolytica* causadora de um tipo de pneumonia bovina. Em 2005, Thanavala e colaboradores descrevem a produção em batata do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) humana. Golovkin e colaboradores em 2007, conseguiram produzir um antígeno do vírus da varíola em plantas transgênicas de tabaco. Já que as plantas realizam modificações pos-traducionais como, glicosilação e formação de pontes de enxofre, espera-se que as proteínas recombinantes produzidas apresentem uma conformação mais semelhante à proteína original do que as proteínas recombinantes produzidas em bactérias, já que essas não realizam tais modificações (SCHILLBERG *et al.*, 2005). Dessa forma, a produção de proteínas recombinantes em plantas seria mais indicada para a produção de vacinas.

Apesar de ter havido outras tentativas (RIBEIRO, 2000 e SILVA, 2003), não há na literatura nenhum registro da expressão de qualquer antígeno

leishmanial em plantas transgênicas. Isso deve decorrer provavelmente do baixo apelo financeiro no desenvolvimento de insumos para uma doença parasitária, e/ou pela dificuldade técnica. Das nove plantas transgênicas de tabaco que obtivemos aqui, uma apenas expressou a proteína LACK recombinante em quantidades detectáveis. A utilização dos códons preferenciais da espécie vegetal é um fator que pode influenciar no rendimento final de produção da proteína recombinante (ADANG *et al.*, 1993; GLEAVE *et al.*, 1998; LONSDALE *et al.*, 1998). Quando foram analisados os códons utilizados na seqüência codificadora do gene LACK (PIZELLI, 1998), foi verificado que vários destes não são os códons preferenciais utilizados pelo tabaco (SILVA, 2003). Isto pode ter contribuído para o baixo rendimento observado, prejudicando a expressão da proteína recombinante em níveis detectáveis nas outras oito plantas. Outra possibilidade é que o gene LACK tenha sido introduzido em uma parte do genoma que não é ativamente transcrita. Isso é possível já que a inserção do gene via *Agrobacterium tumefaciens* se dá de forma aleatória. Cogitou-se a possibilidade da proteína LACK ser tóxica para as plantas (SILVA, 2003). No entanto, esta possibilidade é pequena já que uma das plantas que produzimos, a que utilizamos nos estudos vacinais, expressava o antígeno e cresceu normalmente. No entanto, há a possibilidade desta proteína não estar sendo expressa integralmente, o que no caso de ser tóxica, poderia viabilizar sua expressão. Para confirmar esta hipótese, outros estudos devem ser realizados.

Para a viabilidade do uso de plantas transgênicas como bioreatores, é essencial um alto rendimento das proteínas recombinantes. Geralmente o nível

de expressão de proteínas recombinantes em plantas transgênicas está em torno de 0,1 a 1% do total de proteínas solúveis (DE JAEGER *et al.*, 2002). O rendimento é o resultado da combinação de vários fatores incluindo a eficiência na transcrição e tradução e estabilidade da proteína (ABRANCHES *et al.*, 2005). Além desses, para se conseguir altos níveis de expressão é necessário a utilização de vetores que contenham promotores classificados como fortes, como o CaMV35S e seqüências intensificadoras de transcrição, como a seqüência líder Ω (ULLHA *et al.*, 2003). A otimização da síntese protéica é importante, porém a estabilidade é o fator mais decisivo para o rendimento final. Esta é bastante influenciada pelo sítio intracelular de acúmulo da proteína recombinante. Para proteínas eucarióticas, um alto rendimento foi conseguido quando foram direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático da célula vegetal (CONHAD e FIEDLER, 1998). O sistema endomembrana favorece a ação das chaperonas e formação das pontes dissulfeto. Este também é o local onde as modificações pós-traducionais, como a glicosilação, ocorrem (ABRANCHES *et al.*, 2005). Assim, utilizamos aqui uma seqüência sinal de retenção no retículo endoplasmático (SEKDEL). Verificamos que a expressão do antígeno LACK recombinante produzido pela planta transformada pelo gene que continha a SEKDEL (pGLACKER) se dá em níveis elevados (0,18% do total de tecido foliar seco, ou 6% do total de proteínas solúveis) o que viabilizou sua utilização nos ensaios biológicos.

A administração de plantas transgênicas expressando antígenos imunologicamente relevantes ou de antígenos recombinantes parcialmente

purificados de plantas tem sido utilizada em alguns estudos como estratégia de vacinação oral. Assim, o antígeno HBSAg expresso em batata (planta) administrado por via oral mostrou-se imunogênico em testes clínicos contra a hepatite B (THANAVALA *et al.*, 2005). Em camundongos, o antígeno Cry J II expresso em arroz demonstrou proteção contra alergia causada pelo pólen do cedro japonês quando administrado por via oral (TAKAGI *et al.*, 2005); o antígeno B5 expresso em tabaco demonstrou proteção contra o vírus da varíola (GOLOVKIN *et al.*, 2007); o antígeno ApxIIA expresso em tabaco demonstrou proteção contra a bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (LEE *et al.*, 2001). Em termos de vacina contra outro protozoário, camundongos BALB/c foram vacinados oralmente com extratos de tabaco transgênico expressando o antígeno PyMSP4/5 da superfície do parasito *Plasmodium yoelii* causador de malária murina (WANG *et al.*, 2007). A vacinação com tabaco transgênico expressando PyMSP4/5 foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos, porém não se observou proteção contra a infecção. É provável que os baixos níveis de produção da proteína recombinante (0,25% do total de proteínas solúveis) tenham contribuído para a falha vacinal.

Assim, no nosso estudo, procuramos certificar que os níveis de expressão da proteína LACK no tabaco eram satisfatórios, antes prosseguir com os ensaios *in vivo*. Como mencionado anteriormente, camundongos oralmente vacinados para induzir proteção parcial contra a infecção com *L. amazonensis* desenvolvem uma reação cutânea do tipo Jones Mote de menor intensidade que camundongos não vacinados (PINTO *et al.*, 2003). Nossos resultados na figura 8A mostram uma tendência à diminuição da resposta Jones-Mote em

animais que receberam a planta transgênica, porém sem valor estatístico em relação aos que receberam PBS ($p > 0,05$). No entanto, em animais com infecção ativa, esta resposta foi significativamente reduzida em relação aos controles não-vacinados, podendo-se perceber claramente uma diminuição da resposta Jones-Mote nos grupos vacinados com tabaco transgênico e, em menor grau no grupo vacinado com LaAg (Fig. 8B), corroborando os resultados de Pinto *et al* 2003. Provavelmente essa diminuição da resposta Jones-Mote nos animais vacinados deve-se à tolerização oral ao antígeno LACK. É importante destacar que a administração oral do tabaco selvagem não interferiu nesta resposta cutânea.

Para verificar a eficácia da vacina, administramos oralmente a camundongos BALB/c 4 doses de 10 mg do pó liofilizado das folhas do tabaco transgênico em intervalos de 3-4 dias e passados 7 dias da última dose os animais foram infectados com *L. amazonensis*. Como resultado, observamos um atraso significativo no crescimento da lesão e da carga parasitária após a infecção no grupo vacinado com o tabaco transgênico (Figs. 9 e 10). Esses dados corroboram com resultados anteriores de nosso grupo mostrando que a administração de LaAg oral e de LACK-DNA via mucosa confere proteção a camundongos BALB/c, diminuindo tanto a lesão quanto a carga parasitária (PINTO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2007). Apesar de não ter se mostrado tão proeminente como nos estudos anteriores (PINTO *et al.*, 2003), a vacinação oral com LaAg também exerceu certo grau de proteção ($p < 0,05$) a partir do dia 60 (Fig. 9), melhor evidenciado na avaliação da carga parasitária (Fig. 10). Esta diferença de atividade pode ter sido devida à maior virulência da infecção

obtida aqui, quando comparada com trabalhos anteriores do nosso grupo (Pinto *et al.*, 2003, Pinto *et al.*, 2004). Também foi mostrado que administração oral do tabaco selvagem não provocou alterações no crescimento da lesão. Porém, foi visto que a carga parasitária desse grupo foi menor que a do grupo PBS. Não há na literatura nenhuma menção a ação imunomoduladora do tabaco. No entanto, o tabaco produz diversas substâncias consideradas tóxicas como a nicotina e outros alcalóides (FICHER *et al.*, 2004) que podem estar de alguma forma ativando o sistema imune. Mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A observação de que a administração oral da planta transgênica contendo LACK protegeu parcialmente uma infecção em animais altamente susceptíveis está de acordo com os estudos anteriores em que LACK DNA administrado por via da mucosa nasal protege contra a leishmaniose cutânea e visceral (PINTO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2007). Sabe-se que o sistema imune nos sítios de mucosa age de forma integrada entre si, e responde praticamente da mesma forma a estímulos antigênicos (IWASAKI, 2007). Desta forma, não é de todo surpreendente que o LaAg ou seu componente LACK em contato com a mucosa intestinal ou nasal gerem uma resposta sistêmica similar.

A forma como esta resposta sistêmica foi gerada parece complexa. Apesar de observarmos aqui uma tolerância ao estímulo sistêmico na resposta de Jones-Mote em animais oralmente vacinados com a planta transgênica ou LaAg, o mesmo LaAg pode induzir também uma alta produção de interferon- γ nos linfonodos periféricos (PINTO *et al.*, 2003). Isso pode ser devido ao

favorecimento de respostas Th1 a outros antígenos do parasito após a tolerização ao LACK. Esta hipótese corrobora os estudos anteriores de Julia e colaboradores em 1989 onde camundongos BALB/c expressando o antígeno LACK no timo tornam-se tolerantes a esta proteína e consequentemente mais resistentes à infecção por *L. major*.

Da mesma forma, a tolerização ao LACK pela produção de proteínas semelhantes por bactérias da flora intestinal parece ser importante para um fenótipo de resistência a *L. major* em camundongos C57Bl/6 (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Na ausência dessas proteínas LACK-like produzidas pela flora intestinal, como em camundongos germ-free, camundongos suíços, normalmente resistentes à infecção, passam a apresentar fenótipo de susceptibilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Assim sendo, parece que mesmo na presença da flora bacteriana normal, o antígeno LACK produzido pelo tabaco transgênico foi suficiente para induzir uma resposta imune de tolerância, conferindo proteção.

Apesar de improvável, pela ausência de sequências CpG imunoestimulatórias no plasmídeo pGPTV-KAN-Asc utilizado, não se pode descartar a sua contribuição no efeito da planta transgênica, o que poderia ser avaliado utilizando tabaco expressando o plasmídeo vazio. No entanto, a transformação *via A. tumefaciens* insere genes no genoma da planta de forma aleatória, de forma que um controle idêntico seria difícil de ser reproduzido. Tanto que outros estudos de vacinas comestíveis também não utilizaram plantas-controle transformadas com o plasmídeo vazio (THANAVALA *et al.*, 2005; GOLOVKIN *et al.*, 2007). De qualquer forma, em termos biotecnológicos,

podemos considerar um trunfo ter conseguido uma boa expressão da proteína na planta transgênica, levando a um efeito vacinal protetor, mesmo que parcial, contra a leishmaniose cutânea.

Apesar do tabaco não ser uma planta comestível, este trabalho mostra que uma vacina utilizando planta transgênicas expressando um antígeno do parasito é factível, abrindo novas possibilidades de utilização de plantas comestíveis como a banana, tomate ou cenoura. Além disso, a própria utilização do tabaco como bioreator para produção vacinas em formulações comestíveis pode ser uma estratégia viável.

6. Referências

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. (1998) *Imunologia Celular e Molecular*. 2 ed. Revinter, Rio de Janeiro. 469 pp.

ABRANCHES, R., MARCEL, S., ARCALIS, E., ALTMANN, F., FEVEREIRO, P., STOGER, E. (2005) Plant as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*. 120 : 121-134.

ADANG, M. J., BRODY, M. S., CARDINEAU, G., EAGAN, N., ROUSH, R. T., SHEWMAKER, C. K., JONES, A., OAKES, J. V., MCBRIDE, K. E. (1993) The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII_A gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*. 21: 1131-1145.

AEBISCHER, T., MORRIS, L. e HANDMAN, E. (1994) Intravenous injection of irradiated *Leishmania major* into susceptible BALB/c mice: immunization or protective tolerance. *International Immunology*. 6:1535-1543.

AFONSO, L.C.C., SCHATON, T., VIEIRA, L.Q., WYSOCKA, M., TRICHERI, G., SCOTT, P. (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 263 : 235–237.

AGUILAR, B., DA SILVA, Z. R., PARAGUAI DE SOUZA, E., BORJA-CABRERA, G.P., ROSADO-VALLADO, M., MUT-MARTIN, M., GARCIA-MISS, M. R.; PALATNIK DE SOUSA, C.B., DUMONTEIL, E. (2005). Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 73:812-9.

ALEXANDER, J., BRYSON, K. (2005) T helper(h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*. 99: 17–23.

BERMAN, J. D. (2003) Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion Infection Diseases*. 16: 397-401.

BERMAN, J. D. (1998) Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Current Opinion in Infection Diseases*. 11:707-711.

BELKAID, Y. (2002) CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 168 : 3992-4000.

BORGES, M.M., CAMPOS-NETO, A. SLEATH, P., GRABSTAIN, K.H., MORISSEY, P.J., SKEIKY, Y.A., REED, S.G. (2001). Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. *Infection and Immunity*. 69: 5270-5277.

BORJA-CABRERA, G.P., CRUZ MENDES, A., PARAGUAI DE SOUZA, E., HASHIMOTO OKADA, L.Y., DE A TRIVELLATO, F.A., KAWASAKI, J.K., COSTA, A.C., REIS, A.B., GENARO, O., BATISTA, L.M., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. (2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. 22 : 2234-43.

BRODIE, T.M., SMITH, M.C., Morris, R.V., Titus, R.G. (2007) Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infection and Immunity*. 75(5):2359-65.

BOZZO, S., RETAMAL, C. (1991) Geles unidimensionales. Un Nuevo método densitométrico para computadores personales. *Archivos de biología y medicina experimentales*. 24 : 181.

COLER, R. N., REED, S. G. (2005) Second Generation vaccines against leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 21: 244-249.

CONRAD, U., FIEDLER, U. (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology*. 38 : 101-109.

CROY, R. R. D. (1993) Plant Molecular Biology LABFAX. *Bios Scientific Publishers e Blackwell Scientific Publications*, Oxford.

CONVIT, J., PINARDI, M.E., RONDÓN, A.J. (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host. *Transactions of the Royal Socite of Tropical Medicine and Hygiene*. 66: 603-610.

CRUZ, A., COBURN, C.M., BEVERLEY, S.M. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 7170-7174

DAVIS, A.J., KEDZIERSKI, L. (2005) Recent advances in antileishmanial drug development. *Current opinion in investigational drugs*. 6:163-169.

DEBLAERE, R., BYTEBIER, B., DE GREVE, H., DEBOECK, F., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M. e LEEMANS, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*. 13: 4777-4788.

DE JAEGER, G., SCHFFER, S., JACOBS, A., ZAMBER, M., ZOBELL, O.,GOOSSENS, A., DEPICKER, A., ANGENON, G. (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nature Biotechnology*. 20 :1265–1268.

DE LUCA, P.M., MAYRINK, W., ALVES, C.R., COUTINHO, S.G., OLIVEIRA, M.P., BERTHO, A.L., TOLEDO, V.P., COSTA, C.A., GENARO, O., MENDONCA, S.C. (1999) Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*. 17:1179–1185.

DE WILD, C., HOUDTH, H. V., DE BUCK, S., ANGENON, G., DE JAEGER, G., DEPICKER, A. (2000). Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgenic silencing. *Plant Molecular Biology*, 43: 347-359.

DHALIWAL, J.S., LIEW, F.Y. (1987) Induction of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania major* and the concomitant acceleration of disease development in progressive murine cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 55:645-51.

FARIA, A. M.C., WEINER, H. L. (2005) Oral tolerance. *Immunological Reviews*. 206: 232-259.

FISCHER, U., DRÖGE-LASER, W. (2004) Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant Microbes Interaction*. 17 : 1162-71.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz (Acesso – Agosto de 2005)

GARSIDE, P., MOWAT, McI. (2001) Oral tolerance. *Seminars in Immunology*. 13: 177-185.

GENARO, O., DE TOLEDO, V.P., DA COSTA, C.A., HERMETO, M.V., AFONSO, L.C., MAYRINK, W. (1996) Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clinics in Dermatology*. 14:503-12.

GHALIB, H.W., PIUVEZAM, M. R., SHEIKY, Y.A., HASHIM, F.A., EL-HASSAN, A.M., RUSSO, D.M., REED, S.G. (1993) Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of Clinical Investigation*. 92:324-329.

GIDDINGS, G. (2001) Transgenic Plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 : 450-454.

GIDDINGS, G., ALLISON, G., BROOKS, D., CARTER, A. (2000) Transgenic Plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*. 18: 1151-1155.

GLEAVE, A. P., MITRA, D. S., MARKWIK, N. P., MORRIS, B. A. M., BEUNING, L. L. (1998) Enhanced expression of the *Bacillus thuringiensis* cry9Aa2 gene in transgenic plants by nucleotide sequence modification confers resistance to potato tuber moth. *Molecular Breeding*. 4: 459-472.

GODDIJN, O. J. M., PEN, J. (1995) Plants as bioreactors. *Trends Biotechnology*. 13: 379-387.

GOLLOB, K.J., ANTONELLI, L.R., SOUZA, A.L., TEIXERA, M.M., DUTRA, W.O. (2005) Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*. 21: 347-350.

GOLOVKIN, M., SPITISIN, S., ADRIANOV, V., SMIRNOV, Y., XIAO, Y., POGREBNEYAK, N., M ARKLEY, K., BRODZIK, R., GLEBA, Y., ISAACS, S.N., KOPROWSKI, H. (2007) Smallpox subunit vaccine produced in *Planta* confers protection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 : 6864:6869.

GOMES, D.C.O., PINTO, E.F., MELO, L.D.B., LIMA, W.P., LARRAGA, V., LOPES, U.G., ROSSI-BERGMANN, B. (2007) Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine*. 25 : 2168–2172.

GONZALO, R. M., REAL, G., RODRIGUEZ, J. R., RODRIGUEZ D., HELJASVAARA, R., LUCAS, P., LARRAGA, V., ESTEBAN, M. (2002) A heterologous prime–boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 20: 1226-1231.

GONZALO, R.M., RODRIGUEZ, J.R., RODRIGUEZ, D., GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G., LARRAGA, V., ESTEBAN, M. (2001) Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and Infection*. 3: 701-711

GRAMICCIA, M., GRADONI, L. (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*. 35: 1169-1180.

GRIMALDI Jr., G. (1995) Meetings on vaccine studies towards the control of leishmaniasis. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. 90: 553-556.

GRIMALDI Jr., G., TESH, R. B. (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology*. 6: 230-250.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M., SEDER, R.A. (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Reviews of Immunology*. 18: 927-74.

GURUNATHAN, S., SACKS, D.L., BROWN, D.R., REINER, S.L., CHAREST, H., GLAICHENHAUS, N., SEDER, R.A. (1997) Vaccination with encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine*. 186: 1137-1147.

HANDMAN, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 229-243.

HIATT, A., CAFFERKEY, R., BROWDISH, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342: 76-78.

HOOD, E. E., WOODARD, S. L. (2002) Industrial proteins produced from transgenic plants. *In Plants as Factories for Protein Production*, 119-138. EE Hood and JA Howard (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

HOWARD, J. G., LIEW, F. Y., HALE, C., NICKLIN, S. (1984) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. *Journal of Immunology*. 132: 450-455.

HOWARD, J. G., NICKLIN, S., HALE, C. e LIEW, F. Y. (1982) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *Journal of Immunology*. 129: 206-2212.

HOWARD, J.G., HALE, C., LIEW, F.Y. (1980) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. *Journal of Experimental Medicine*. 152:594-607.

IWASAKI, A. (2007) Mucosal dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 25: 381-418.

JULIA, V., GLAICHENHAUS, N. (1999) CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infection and Immunity*. 67: 3641-3644.

JULIA, V., RASSOULZADEGAN, M., GLAICHENHAUS, N. (1996) Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science*. 274: 421-423.

KEDZIERSKI, L., ZHU, Y., HANDMAN, E. (2006) *Leishmania* vaccines: Problems and problems. *Parasitology*. 133: S87-S112

KELLY, B.L., STETSON, D.B., LOCKSLEY, R.M. (2003) *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *Journal of Experimental Medicine*. 198: 1689-98.

KEMP, M, THEANDER, T.G. (2000) Leishmaniasis. *Ugeskr Laeger*. 162: 66203-6207

KHARASMI, A., KEMP, K., ISMAIL, A., GASIM, S., GAAFAR, A., KURTSHALS, J.A., EL HASSAM, A.M., THEANDER, T.G., KEMP, M., (1999) T-cell response in human leishmaniasis. (1999) *Immunology Letters*. 65: 105-108.

KLINMAN, D.M., YI, A.K., BEAUCAGE, S.L., CONOVER, J., KRIEG, A.M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 2879-83.

LAINSON R. & SHAW J.J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. *The leishmaniasis*, Academic Press Inc., London 1-20.

LAUNOIS, P., MAILLARD, I., PINGEL, S., SWIRHART, K.G., XENARIUS, I., ACHAORBEA, H., DIGGELMANN, H., LOCKSLEY, R.M., MACDONALD, H.R., LOUIS, J.A. (1997) IL4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4 (+) T cells instructs the development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*. 6: 541-549.

LEE, R.W., STROMMER, J., HODGINS, D., SHEWEN, P.E., NIU, Y., LO, R.Y. (2001) Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infection and Immunity*. 69: 5786-93.

LIEW, F. Y., HOWARD, J. G., HALE, C. (1984) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt-1+2- T cells that do not mediate cutaneous DTH. *Journal of Immunology*. 132: 456-461.

LIEW, F. Y., HALE, C. e HOWARD, J. G. (1985) Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*. 135: 2095-2101.

LONSDALE, D. M., MOISAN, L. J., HARVEY, A. J. (1998) The effect of altered codon usage on luciferase activity in tobacco, maize and wheat. *Plant Cell Reports*. 17: 396-399.

MA, J. K.C., DRAKE, P. M. W., CHRISTOU, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4 : 794-805.

Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2007 a). 2 ed. Editora do Ministério da Saúde; 182p; Brasília.

MARQUES-DA-SILVA, E.A., COELHO, E.A., GOMES, D.C., VILELA, M.C., MASIOLI, C.Z., TAVARES, C.A., FERNANDES, A.P., AFONSO, L.C., REZENDE, S.A. (2005) Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research*. 98: 67-74.

MARZOCHI, K. B. F., MARZOCHI, M. C. A, SILVA, A. F., GRATIVOL, N., DUARTE, R., CONORT, E. M., MODABBER, F. (1998) Phase 1 study of an inactivated vaccine

against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 205-212.

MASON, H. S., LAM, D. M. -K., ARNTZEN, C. J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 89: 11745-11749.

MAZUMDER, S., RAVINDRAN, R., BANERJEE, A., ALI, N. (2007) Non-coding pDNA bearing immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine*. 25: 8771-81.

MCSORLEY, S. J., GARSIDE, P. (1999) Vaccination by inducing oral tolerance? *Immunology Today* 20: 555-560.

MCSORLEY, S. J., RASK, C., PICHOT, R., JULIA, V., CZERKINSKY, C. e GLAICHENHAUS, N. (1998) Selective tolerization of T_H1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate. *European Journal of Immunology*. 28: 424-432.

MEDZHITOV, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1: 135-45.

MELBY, P.C., YANG, J., ZHAO, W., PEREZ, L.E., CHENG, J. (2001) *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 22: 4719-4725.

MÉNDEZ, S., BELKAID, Y., SEDER, R.A., SACKS D. (2002) Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 20: 3702-3708.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Reviews of Immunology*. 7:145-73.

MOUGNEAU, E., ALTARE, F., WAKIL, A. E., ZHENG, S., COPPOLA, T., WANG, Z. E., WALDMAN, R., LOCKSLEY, R. M., GLAICHENHAUS, N. (1995) Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*. 268: 563-566.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R., SARAVIA, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. 366: 1561-1577.

NEVES, D.P. (2002) Parasitologia humana. 10^a ed. *Ed. Atheneu* pp.31-72.

OKUNO, T., TAKEUCHI, M., MATSUMOTO, Y., OTSUKA, H., MATSUMOTO, Y. (2002) Pretreatment of *Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*. *Experimental Animals*. 51: 335-341.

OLIVEIRA, M. R., TAFURI, W.L., AFONSO, L. C. C., OLIVEIRA, M.A.P., NICOLI, J. R., VIEIRA, E. C., SCOTT, P., MELO, M.N., L. Q. VIEIRA (2005) Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*. 131:1-12.

PANAHI, M., ALLI, Z., CHENG, X., BELBARAKA, L., BELGOUDI, J., SARDADNA, R., PHIPPS, J., ALTOSSAR, I. (2004) Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produced biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants. *Transgenic Research*. PC1142: 1-15.

PINGEL, S., LAUNOIS, P., FOWELL, D. J., TURCK, C. W., SOUTHWOOD, S., SETTE, A., GLAICHENHAUS, N., LOUIS, J. A. e LOCKSLEY, R. M. (1999) Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. *Journal of Experimental Medicine*. 189: 1111-1120.

PINTADO, V., LÓPEZ-VÉLEZ, R. (2001) Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19: 353-7.

PINTO, E.F., CORTEZIA M.M., ROSSI-BERGMANN, B. (2003) Interferon gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 21: 3534-3541.

PINTO, E. F., PINHEIRO, R. O., RAYOL, A., LARRAGA, V., ROSSI-BERGMANN, B. (2004) Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infection and Immunity*. 72: 4521 – 4527.

PIZZELI, J.M. (1998) Amplificação da seqüência codificadora do gene LACK de *Leishmania chagasi* e clonagem em vetores de expressão em plantas. Monografia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos - RJ.

RAMIRO, M. J., ZÁRATE J. J., HANKE, T., RODRIGUEZ, D., RODRIGUEZ, J. R. , ESTEBAN, M., LUCIENTES, J., CASTILLO, J. A., LARRAGA, V. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*. 21: 2474-2484.

REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual review of Immunology*. 13: 151-177.

RIBEIRO, J. M. (2000) Clonagem do gene *LACK* de *Leishmania chagasi* em um vetor binário e transformação de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). Monografia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos - RJ. 45 pp.

ROGERS, K.A., DEKREY, G.K., MBOW, M.L., GILLESPIE, R.D., BRODSKYN, C.I., TITUS, R.G. (2002) Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*. 209: 1-7.

ROGERS, M. E., ILG, T., NIKOLAEV, A. V. (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 430: 463–467.

ROBERTS, M. T. M. (2006) Current Understandings on the Immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Boletins*. 76: 115-130.

RUSSO, D.M., BURNS Jr., J.M., CARVALHO, E.M., ARMITAGE, R.J., GRABSTEIN, K.H., BUTTON, L.L., McMASTER, W.R., REED, S.G.J. (1991) Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *Journal of Immunology*. 147: 3575-3580.

SAKTHIANANDESWAREN, A., ELSO, C.M., SIMPSON, K., CURTIS, J.M., KUMAR, B., SPEED, T.P., HANDMANN, E., FOOTE, S.J. (2005) The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 15551-15556.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., F., MANIATS, T. (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor Press, USA.

SANTOS, W.R., AGUIAR, I.A., PARAGUAI DE SOUZA, E., DE LIMA, V.M., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. (2003). Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. 21: 4668-76.

SCHILLBERG, S., TWYMAN, R.M., FISCHER, R. (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants--technology assessment. *Vaccine*. 23:1764-9.

SCOTT, P (2005) Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Celular Microbiology*. 7: 1707-1713.

SEDER, R.A., SACKS, D.L. (2004) Memory may not need reminding. *Nature Medicine*. 10: 1045-1047.

SILVA, A. O. (2003) Transformação De plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com o gene *LACK* de *Leishmania chagasi* e avaliação de sua expressão. Tese de mestrado, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos.

SILVA, A. O. (2000) Clonagem do gene quimérico 35S LACKER em um vetor binário de transformação de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) Monografia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos - RJ.

SINGH, R.K., PANDEY, H.P., SUNDAR, S. (2006) Visceral leishmaniasis (kala-azar): Challenges ahead. *Indian Journal of Medical Research*. 123: 331-344.

SHEIKY, Y.A.W., BENSON, D.R., ELWASILA, M., BADARÓ, R., BURNS, J.M., REED, S.G. (1994) Shared antigens between *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*: characterization of the *Leishmania chagasi* acidic ribosomal protein PO. *Infection and Immunity*. 62: 1643-1651.

SOLDERA, S., MCSORLEY, S. J. e GLAICHENHAUS, N. (1997) Selective down-regulation of Th2 immune responses following treatment with antigen-coupled splenocytes. *European Journal of Immunology*. 27: 848-854.

SOTO, J., SOTO, P. (2006) Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Review Anti Infective Therapy*. 4: 177-85.

SOUSSI, N., SAKLANI-JUSFORGUES, H., COLLE, J., MILON, G., GLAICHENHAUS, N., GOOSSENS, P.L. (2002) Effect of intragastric and intraperitoneal immunisation with attenuated and wild-type LACK-expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. *Vaccine*. 20: 2702-2712.

SUNDAR, S., RAI, M. (2002) Advances in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 15: 593-598.

TACKET, C. O., MASON, H. S. (1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes and Infection*. 1: 777-783.

TAKAGI, H., HIROI, T., YANG, L., TADA, Y., YUKI, Y., TAKAMURA, K., ISHIMITSU, R., KAWAUCHI, H., KIYONO, H., TAKAIWA, F. (2005) A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 17525-17530.

TAPIA, E., PÉREZ-JIMENEZ, E., LÓPEZ-FUERTES, L., GONZALO, R., GHERARDI, M. M., ESTEBAN, M. (2003) The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus expressing p36/LACK. *Microbes and Infection*. 5: 73-84.

THANAVALA, Y., MAHONEY, M., PAL, S., SCOTT, A., RICHTER, A., NATARAJAN, N., GOODWIN, P., ARNTZEN, C.J., MASON, H.S. (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 3378-3382.

TITUS, R.G., LIMA, G.C., ENGERS, H.D., LOUIS, J.A. (1984) Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed-type hypersensitivity. *Journal of Immunology*. 133:1594-600.

ULLAH, A. H., SETHURNADHAVAN, K., MULLANEY, E.J., ZIEGELHOFFER, T., AUSTIN-PHILLIPS, S. (2003) Fungal phy A gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 306 : 603-609.

VOLLMER J. (2005). Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 5: 673-82.

VON STEBUT, E., UDEY, M.C. (2004) Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*. 6: 1102-1109.

WANG, L., WEBSTER, D.E., CAMPBELL, A.E., DRY, I.B., WESSELINGH, S.L., COPPEL, R.L. (2008) Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. *International Journal of Parasitology*. 38: 103-10.

WALKERPEACH, C. R. e VELTEN, J. (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *In: Gelvin, S. B. e*

Schilperoort, R. A. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1:1-19.

WEHI – Walter and Elisa Hall Institute (2003) <http://www.wehi.edu.au>

WEINER D.B. & KENNEDY R.C. (1999) Genetic vaccines. *Scientific American* 281: 50-57.

WEINER, H. L. (1997) Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology Today*. 18: 335-343.

WEINER, H. L., MAYER, L. F. (1996) Introduction, p. xiii-xviii. In Weiner, H. L. e Mayer, L. F. (eds) *Oral Tolerance – Mecanisms and Applications*. Ann. New York Acad. Sci., vol. 778. The New York Academy of Sciences, New York. 453 pp.

WEN, S.X., TEEL, L.D., JUDGE,N.A., O'BRIAN,A.D. (2006) A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.103:7082-7087.

WHITACRE, C. C., GIENAPP, I. E., MEYER, A., COX, K. L. e JAVED, N. (1996) Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis, p. 217-227. In Weiner, H. L. e Mayer, L. F. (eds) *Oral Tolerance – Mecanisms and Applications*. Ann. New York Acad. Sci., vol. 778. The New York Academy of Sciences, New York. 453 pp.

WHO - World Health Organization Leishmaniasis Web Page (2005) <http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm>

WHO-TDR – Tropical Diseases Special Programme for Research and Training Web Page (2002) <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>

ZAPH, C., UZONNA, J., BEVERLEY, S.M., SCOTT, P. (2004) Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nature Medicine*. 10:1104-1110.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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