

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Reconstituição de proteínas das formas amastigotas de
Leishmania amazonensis em lipossomos e o seu uso na
vacinação contra a leishmaniose cutânea experimental**

Fabiana Rodrigues dos Santos Gonçalves

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fabiana Rodrigues dos Santos Gonçalves

**Reconstituição de proteínas das formas amastigotas de
Leishmania amazonensis em lipossomos e o seu uso na
vacinação contra a leishmaniose cutânea experimental**

Tese Apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências, Área: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto
Co-Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Fabiana Rodrigues

Reconstituição de proteínas das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* em lipossomos e o seu uso na vacinação contra a leishmaniose cutânea experimental.

Ribeirão Preto, 2007.

98 p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Área de concentração em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto

Co-Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

1. *Leishmania amazonensis* - 2. Amastigotas - 3. Lipossomos - 4. Vacinação

NESTE TRABALHO, O PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO FOI APROVADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) (**ANEXO 1**). PARTE DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTA TESE FOI UTILIZADA PARA A ELABORAÇÃO DE UM ARTIGO CIENTÍFICO (**ANEXO 2**).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus filhos e ao meu marido...

Aos meus pais, Januário e Elisabete, que estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas em que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria.

Quero agradecer pelo apoio incondicional, sem mágoas nem rancores, agradecer de peito aberto, de alma explosiva. Hoje quero parar e agradecer.

Aos meus filhos, Isabela e Pedro, por terem me ensinado que a felicidade não está no fim da jornada e sim, em cada curva do caminho que percorremos para encontrá-la.

Ao Luciano, com quem aprendi que numa relação de amor, nenhum dos parceiros deveria sentir que tem que abrir mão de uma parte essencial de si mesmo para torná-la viável.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto* por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Seus conselhos e sugestões foram indispensáveis para o meu amadurecimento durante a realização desta tese e pelo meu crescimento profissional. Ao término de mais essa etapa da minha vida, gostaria de expressar meu carinho e reconhecimento por esse grande professor.

Ao *Prof. Dr. Pietro Ciancaglini* pela gentileza com que me recebeu quando eu fui procurá-lo para trabalhar com os proteolipossomos. Toda a minha gratidão pelo zelo com que cuidou do meu caminhar durante os experimentos realizados em seu laboratório. Obrigada *Professor Pietro*, pela convivência amigável e por tudo que me ensinou. O senhor constitui para mim um exemplo não só de pesquisador, mas também de grande ser humano.

À *Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato Martins* pelo carinho e atenção nos momentos em que recorri à sua competência em Imunologia. Sou grata pela sua valiosa orientação no planejamento de experimentos e por disponibilizar o acesso ao seu laboratório.

Ao *Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira* pela orientação segura e constante nos aspectos de Bioquímica. Sou muito grata pela atenção amistosa com que sempre me recebeu quando fui procurá-lo.

Ao *Prof. Dr. João Santana da Silva*, não só por ter aceitado participar da avaliação da minha tese, mas principalmente por ter cedido os animais *knock-out* usados neste trabalho, orientando a maneira adequada de utilizá-los. Obrigada também por facilitar o acesso aos seus técnicos e aos equipamentos do seu laboratório.

Aos *Profs. Drs. Vera Lúcia Garcia Calich e Maurício Martins Rodrigues*, membros da banca examinadora, pelas importantes sugestões incorporadas neste trabalho. Agradeço em especial a *Profa. Dra. Ana Paula Fernandes* pelo cuidado e paciência, tanto em corrigir os erros gramaticais como sugerir mudanças, que ao meu ver, contribuíram para o aprimoramento do texto.

Ao *Júlio Anselmo Siqueira*, responsável pelo Biotério de Criação de Camundongos Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento dos camundongos BALB/c e C57BL/6 utilizados no decorrer deste trabalho. Sou muito grata ao *Júlio* pela atenção e paciência que sempre teve comigo, nos inúmeros telefonemas que eu fiz perguntando quando ele disponibilizaria os camundongos requisitados. *Júlio*, a sua colaboração foi essencial para que os experimentos *in vivo* fossem realizados e concluídos em tempo hábil.

Ao *Sávio Hedley Miranda* e ao *Ednelson Aparecido Mazzotto*, funcionários do biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por garantirem o bem-estar dos camundongos isogênicos em experimentação e também por assegurarem cuidados especiais aos camundongos *knock-out*.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela atenção, competência e presteza com que sempre me atenderam. Agradeço em particular, *Victor Diaz Galban* e a secretária da pós-graduação em Bioquímica, *Maria Ivone Campos Fonseca*.

Eu agradeço *Denise Brufato Ferraz* pela participação durante todas as etapas deste meu trabalho. Obrigada pela competência, seriedade e profissionalismo com que sempre me auxiliou. *Denise* obrigada, acima de tudo, pela sua amizade, tão grande e sincera. Sou imensamente feliz por ter te conhecido e por estar ao lado de uma pessoa tão maravilhosa como você.

À *Kátia Regina Perez Daghasanli* por ter me ensinado toda a metodologia da construção e caracterização dos proteolipossomos. *Kátia*, agradeço a sua orientação, feita com carinho, dedicação e paciência.

Agradeço *Hérica de Lima Santos*, *Ivana Aparecida Borin*, *Luiz Eduardo dos Reis Santos*, *Maytê Bolian*, *Nilton Rosa Alves*, *Prislaine Pupolin Magalhães*, *Ricardo Melo Neves* e *Roberto Publio*, colegas e técnicos do laboratório do Prof. Dr. *Pietro Ciancaglini*, situado no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia e Letras de Ribeirão Preto. Muito obrigada por terem me recebido com tanta gentileza quando eu iniciei os experimentos de construção dos proteolipossomos. Em especial eu agradeço *Ana Maria Sper Simão*, *Carolina*

Fortes Rigos e Tony de Paiva Paulino por serem sempre prestativos e terem me auxiliado sempre que necessário. Serei eternamente grata por tudo o que vocês fizeram por mim.

Eu agradeço a minha amiga *Andressa Rodrigues de Souza* por ter me ajudado exaustivamente na correção das primeiras versões deste trabalho. Obrigada também pelos momentos felizes que compartilhamos durante todos estes anos. *Andressa*, foi muito bom ter convivido todos os dias ao lado de uma pessoa tão especial como você.

Às minhas amigas *Fernanda Lopes Menini* e *Vanessa Migliaccio* pela amizade, carinho e cumplicidade. As nossas vidas tomaram caminhos diferentes, mas eu nunca me esquecerei de vocês.

Eu agradeço *Izaltina Silva Jardim* pela valiosa participação durante as primeiras etapas deste trabalho. *Iza*, você é uma pessoa muito especial e eu sou sinceramente grata pela sua amizade e por tudo que aprendi com você.

À *Marcelle Carolina Colhone* por trazer tanta alegria e descontração para o nosso laboratório. Obrigada por sempre ter me ajudado no que eu precisei.

À *Mariana Drummond Costa Ignacchiti* e *Viviane Aline Oliveira Silva* por todos os momentos de felicidade que partilhamos juntas. Momentos estes que foram curtos, mas que ficarão para sempre guardados comigo.

À estagiária *Amélia Rodrigues de Souza* e à ex-aluna de Iniciação Científica *Patrícia Fiorani Pennabel* pela convivência muito agradável e pelas conversas que tornam o ambiente do laboratório sempre alegre.

Ao meu irmão *Fábio José dos Santos*, um grande exemplo de disciplina e dedicação aos estudos. Obrigada pela amizade, pelas conversas e pelo apoio em todos os momentos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - A leishmaniose	2
1.2 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	4
1.3 – Tratamento	7
1.4 – Vacinação	8
1.5 - Fatores de resistência e suscetibilidade do hospedeiro na leishmaniose.....	14
1.6 - Os lipossomos.....	18
2 – OBJETIVOS	20
2.1 - Objetivos gerais.....	21
2.2 - Objetivos específicos.....	21
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 - Animais de experimentação	23
3.2 – Parasitas	23
3.3 - Meio de cultura.....	23
3.4 - Obtenção e cultivo dos parasitas	24
3.5 - Preparação do soro contendo os anticorpos contra os determinantes imunogênicos de <i>L. amazonensis</i>	24
3.6 - Preparação do extrato bruto de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	25
3.7 - Solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> empregando-se diferentes detergentes.....	25
3.8 - Estudo das condições ótimas de solubilização, conforme descrito por Santos e Ciancaglini (2000)	25
3.8.1 - O efeito da concentração do detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26
3.8.2 - O efeito da concentração da proteína na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26

3.8.3 - O efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26
3.9 - Eletroforese em condição desnaturante [SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)]	27
3.10 - Coloração pela prata	27
3.11 - <i>Western Blotting</i>	28
3.12 - Preparação dos proteolipossomos e lipossomos.....	29
3.13 - Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico	30
3.14 - Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	30
3.15 - Avaliação da concentração de lipídeos	31
3.16 - Dosagem de proteínas	31
3.17 - Dosagem de fosfato inorgânico.....	32
3.18 - Dosagem de colesterol.....	32
3.19 - Imunização de camundongos com os proteolipossomos e avaliação da proteção contra a infecção com <i>L. amazonensis</i>	33
3.20 - Avaliação <i>in vivo</i> do papel de IFN- γ e IL-12 na proteção induzida pelos proteolipossomos contra a leishmaniose cutânea experimental.....	34
4 – RESULTADOS	35
4.1 - O efeito de diferentes detergentes na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	36
4.2 - O efeito da concentração do detergente na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	38
4.3 - O efeito da concentração da proteína na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	44
4.4 - O efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	44
4.5 - Preparação e caracterização dos proteolipossomos preparados com diferentes razões em massa de DPPC, DPPS e colesterol.....	47
4.6 - Caracterização dos proteolipossomos preparados com 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol	52

4.7 - Avaliação da proteção contra a infecção com <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c após duas imunizações com os proteolipossomos por via i.p. ou s.c.....	58
4.8 - Avaliação da proteção contra a infecção com <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c e C57BL/6 após uma imunização com os proteolipossomos por via i.p.....	61
4.9 - Avaliação da proteção contra a infecção com <i>L. amazonensis</i> em camundongos BALB/c após uma imunização com os proteolipossomos por via i.p...	66
4.10 - Avaliação <i>in vivo</i> do papel de IFN- γ e IL-12 na proteção de camundongos C57BL/6 após a imunização com os proteolipossomos por via i.p.....	69
5 – DISCUSSÃO	73
6 – CONCLUSÕES.....	85
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> (modificado de DPDx, 2006)	6
Figura 2 - <i>Leishmania major</i> : resposta imunológica protetora e não protetora (modificado de Alexander & Bryson, 2005)	16
Figura 3 - Efeito de diferentes detergentes na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	37
Figura 4 - (A) Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata e (B) <i>Western Blotting</i>	39
Figura 5 - Efeito da concentração do Polidocanol na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	41
Figura 6 - Efeito da concentração do SDS na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	42
Figura 7 - Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata	43
Figura 8 - Efeito da concentração da proteína na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Figura 9 - Efeito da temperatura e do tempo de incubação na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 10 - Análise da distribuição por tamanho dos proteolipossomos preparados com as diferentes combinações lipídicas	50
Figura 11 - Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata	51
Figura 12 - Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose	53
Figura 13 – TLC	54
Figura 14 - (A) Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata e (B) <i>Western Blotting</i>	57
Figura 15 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. ou s.c. com EBS, lipossomos ou tampão e desafiados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	59
Figura 16 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. ou s.c. com proteolipossomos ou tampão e desafiados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60

Figura 17 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados por via i.p. com tampão, lipossomos, EBS ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	63
Figura 18 - Nível de proteção de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	64
Figura 19 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados por via i.p. com tampão ou 40 μ g de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	65
Figura 20 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^5 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	67
Figura 21 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^4 promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	68
Figura 22 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão, 80 ou 120 μ g de proteolipossomos e desafiados com 10^4 promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	70
Figura 23 - O papel <i>in vivo</i> de IFN- γ e IL-12 na proteção de camundongos C57BL/6 induzida pelos proteolipossomos	71
Tabela I - Espécies de <i>Leishmania</i> e doenças humanas associadas (modificado de McMahon-Pratt & Alexander, 2004)	3
Tabela II - Características dos proteolipossomos preparados com diferentes razões em massa de DPPC, DPPS e colesterol	48
Tabela III - Composição lipídica dos lipossomos e dos proteolipossomos determinada por TLC.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A2: antígeno específico da forma amastigota de *Leishmania*
APCs: células apresentadoras de antígeno
B: célula B
BCG: bacilo de Calmette-Guérin
BSA: soro albumina bovina
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CHAPSO: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate)
CMC: concentração micelar crítica
CPs: cisteíno-proteinases
CPB: cisteíno-proteinase B
CR1: receptor de complemento 1
CR3: receptor de complemento 3
DAB: 3,3' diaminobenzidina
DCs: células dendríticas
DHFR-TS: dihidrofolato redutase-timidilato sintase
DNA: ácido desoxirribonucléico
DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPS: dipalmitoil fosfatidilserina
E-64: *trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane*
EBS: Extrato Bruto Solubilizado
EDTA: ácido etileno diamino tetra acético
FDA: *Food and Drug Administration*
FML: ligante de fucose e manose
gp46: glicoproteína da superfície da *Leishmania* com peso de 46 kDa
gp63: glicoproteína da superfície da *Leishmania* com peso de 63 kDa
GPI: glicosil fosfatidil inositol
H1: histona 1
H2A: histona 2A
H2B: histona 2B
H3: histona 3
H4: histona 4
HASPB1: *hydrophilic acylated surface protein B1*
HCl: ácido clorídrico
ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ : interferon- γ
IFN- γ KO: *knock-out* para IFN- γ
IgG: imunoglobulina G
IgG1: imunoglobulina G1
IgG2: imunoglobulina G2
IL-2: interleucina-2
IL-4: interleucina-4
IL-5: interleucina-5
IL-10: interleucina-10
IL-12: interleucina-12
IL-13: interleucina-13
IL-12 KO: *knock-out* para IL-12
i.d.: intradérmica
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
i.v.: intravenosa
KO: *knock-out*
LACK: *Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase
LCR1: antigen cloned from amastigote *L. chagasi* library
LeIF: *Leishmania* elongation initiation factor
LmSTI1: *Leishmania* major stress-inducible protein 1
LPG: lipofosfoglicano
M ϕ : macrófago
MF59: emulsão de óleo em água
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MPL[®]-SE: *monophosphoryl lipid A-squalene*
NK: *natural Killer*
NO: óxido nítrico
O₂⁻: ânion superóxido
ONO-4007: análogo sintético do lipídeo A
P4: antígeno específico da forma amastigota de *Leishmania*
P8: antígeno específico da forma amastigota de *Leishmania*
PBS: salina tamponada com fosfato

PFP: proteína formadora de poro

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

Polidocanol: *polyoxyethylene 9-lauryl ether*

s.c.: subcutânea

Sch: Schneider

Sch/SFB: Schneider contendo sulfato de gentamicina e soro fetal bovino

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB: soro fetal bovino

TCR: receptor de antígeno de célula T

TC-TOX: PFP descrita para o *T. cruzi*

TGF- β : fator β de crescimento e transformação

Th1: *T helper 1*

Th2: *T helper 2*

TLC: cromatografia em camada delgada

Treg: células T regulatórias

Tris: *(hydroxymethyl)-aminomethane*

TSA: *thiol-specific antioxidant*

Tween 20: *polyoxyethylenesorbitan monolaurate*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WT: tipo selvagem

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar se proteolipossomos carregando proteínas de membrana da forma amastigota de *L. amazonensis* poderiam induzir uma imunidade protetora contra a leishmaniose cutânea experimental. Como um passo preliminar para preparar os proteolipossomos, as amastigotas eram sonicadas e misturadas com diferentes detergentes. O SDS (dodecil sulfato de sódio) se mostrou mais eficiente do que os detergentes neutros ou zwitteriônicos em promover a solubilização das proteínas de membrana do parasita. O máximo de solubilização foi alcançado instantaneamente usando 0,5 mg/mL de proteína e 0,1 % de SDS. A melhor reconstituição das proteínas em lipossomos foi obtida usando DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina), DPPS (dipalmitoil fosfatidilserina) e colesterol na razão em massa de 5:1:4 e 0,5 mg/mL de proteína solubilizada. Esse protocolo gerou proteolipossomos com uma razão em massa de DPPC, DPPS e colesterol de 1:1:5. Para avaliar a imunidade protetora, os camundongos BALB/c eram vacinados pela via intraperitoneal com 10, 20 ou 40 µg de proteolipossomos e após três semanas eram desafiados na pata com 10⁶ promastigotas de *L. amazonensis*. A proteção foi avaliada durante 12 semanas, por meio da medida do tamanho das lesões causadas pelo parasita. Doze semanas após a infecção, os camundongos BALB/c imunizados com 10 ou 20 µg de proteolipossomos mostraram uma proteção de 25 e 35 %, respectivamente, quando comparados com os camundongos que receberam tampão. Além disso, os camundongos imunizados com 40 µg de proteolipossomos apresentavam uma proteção de 69 % com 6 semanas de infecção e esse valor caiu para 50 % no final do experimento. Aumentando a concentração dos proteolipossomos e diminuindo o número de promastigotas no momento do desafio, o nível de proteção foi de 100 %. Essa proteção foi observada por 39 semanas nos camundongos BALB/c imunizados com 120 µg de proteolipossomos e desafiados com 10⁴ promastigotas de *L. amazonensis*. Esses resultados indicam que a vacinação dos camundongos com os proteolipossomos induz uma imunidade protetora contra a *L. amazonensis*. Por outro lado, a vacinação com os proteolipossomos não protege camundongos C57BL/6 *knock-out* para interleucina-12 ou interferon-γ. Nossos resultados com os camundongos *knock-out* indicam que a proteção contra a *L. amazonensis* através da vacinação com os proteolipossomos é dependente de interleucina-12 e interferon-γ.

ABSTRACT

The present study was designed to investigate if proteoliposomes carrying membrane proteins of *L. amazonensis* amastigotes could induce protective immunity to infection in BALB/c mice. As a preliminary step to prepare the proteoliposomes, amastigotes were sonicated and mixed with different detergents. SDS (sodium dodecyl sulfate) was shown to be more effective than neutral or zwitterionic detergents in promoting solubilization. The maximum of solubilized proteins was achieved instantaneously using 0.5 mg/mL of protein and 0.1% SDS. An optimization for protein reconstitution into liposomes was obtained using the mixtures of DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine), DPPS (dipalmitoyl phosphatidylserine) and cholesterol, at weight ratio of 5:1:4 and 0.5 mg/ml of solubilized protein. This system generated proteoliposomes presenting a final lipid weight ratio for DPPC, DPPS and cholesterol of 1:1:5. To assay protective immunity, BALB/c mice were injected intraperitoneally with either 10, 20 or 40 µg of proteoliposomes and three weeks later challenged in the footpad with 10^6 *L. amazonensis* promastigotes. Protective immunity was evaluated weekly for up to 12 weeks by measuring the size of lesions caused by the parasite. At 12 weeks post infection, BALB/c mice immunized with 10 or 20 µg of proteoliposomes showed a protection of 25 and 35 %, respectively, as compared to mice that received only the buffering solution. Furthermore, mice immunized with 40 µg of proteoliposomes displayed a maximum protection of 69 % at 6 wk, decreasing to 50 % at 12 wk post-infection. A further degree of protection was observed by increasing the dose of proteoliposomes and decreasing the number of promastigotes injected. BALB/c mice immunized with 120 µg of proteoliposomes and challenged with 10^4 *L. amazonensis* promastigotes showed a protection of 100 %, for up to 39 weeks, as compared to control mice. These results indicate that proteoliposomes may be used to induce protective immunity against *L. amazonensis* in mice. Vaccination with proteoliposomes failed to induce protection in either interleukin-12 or interferon- γ knock-out C57BL/6 mice. Our results with knock-out mice indicate that the protection against *L. amazonensis* by vaccination with proteoliposomes is dependent on interleukin-12 and interferon- γ .

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A leishmaniose

Entre as doenças consideradas como negligenciadas, inclui-se a leishmaniose. O termo doenças negligenciadas se aplica àquelas doenças que não recebem investimentos consideráveis em pesquisa das companhias farmacêuticas, devido à baixa perspectiva de lucro com a venda dos medicamentos, uma vez que afetam populações miseráveis de países pobres. Os medicamentos que eventualmente poderiam tratar tais doenças, caso descobertos, não constituiriam um mercado consumidor atraente, pela falta de recursos das populações afetadas. A leishmaniose é um exemplo de doença negligenciada que afeta cerca de 12 milhões de indivíduos, com 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano e 350 milhões de pessoas sob risco de infecção (Desjeux, 2004). Essa doença apresenta um elevado índice de mortalidade, sendo uma importante parasitose endêmica em 88 países de vários continentes, destacando-se países tropicais e sub-tropicais (WHO, 2006).

As leishmanioses podem ser classificadas, de acordo com suas manifestações clínicas, em quatro grupos: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (**Tabela I**). A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões ulceradas, desenvolvidas geralmente no local da picada do inseto vetor. Essas lesões também podem ocorrer de forma disseminada. Na leishmaniose cutânea difusa as lesões são nodulares, não ulceram e apresentam-se disseminadas. Essa forma da doença está, em geral, associada a um sistema imune debilitado. A forma mucocutânea, por sua vez, pode causar destruição total ou parcial das mucosas do nariz, boca e faringe, sendo geralmente acompanhada por infecções secundárias. A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica muito grave, na qual há migração dos parasitas para o fígado, baço e medula óssea. Essa forma é caracterizada por febre irregular, perda de peso, aumento do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia) (Desjeux, 2004).

Tabela I - Espécies de *Leishmania* e doenças humanas associadas (modificado de McMahon-Pratt & Alexander, 2004)

<u>Forma da doença</u>	<u>Espécies do Novo Mundo</u>	<u>Espécies do Velho Mundo</u>
Cutânea	Complexo <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (Viannia)</i>	Complexo <i>L. (L.) major</i> <ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i> <ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lansonii</i> <i>L. (V.) naiff</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>
Cutânea difusa	<ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> 	<i>L. (L.) aethiopica</i>
Mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i>	
Visceral	Complexo <i>L. (L.) donovani</i>	<ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) donovani</i>

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários que pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Esse parasita foi primeiramente observado em 1885 por Cunningham e, subsequente, descrito por Leishman e Donovan em 1903 (citado em Peters, 1987). Lainson & Shaw (1987) propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. Para isso, basearam-se principalmente no desenvolvimento das espécies no intestino do inseto vetor, além de diferenças detectáveis por técnicas bioquímicas, imunológicas e de biologia molecular, associadas aos critérios clássicos de morfologia, desenvolvimento em meio de cultura e distribuição geográfica.

1.2 - Ciclo biológico da *Leishmania*

Todas as espécies de *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos de mamíferos (cães, raposas, roedores, marsupiais, entre outros) e são transmitidas ao homem por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (Killick-Kendrick, 1990). A multiplicação da *Leishmania* nos seus hospedeiros ocorre por fissão binária e nenhum ciclo sexual foi descrito até o momento. Durante seu ciclo evolutivo, esses protozoários apresentam duas formas principais: as promastigotas e as amastigotas. As promastigotas são formas alongadas, flageladas, móveis, que vivem no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor e as amastigotas são formas arredondadas, sem flagelo aparente, que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (Courret *et al.*, 2001). Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, as formas promastigotas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado sendo, posteriormente, fagocitadas.

A ligação e a internalização das formas promastigotas durante o processo de fagocitose são eventos mediados por receptores presentes na membrana do macrófago que

interagem com os seus respectivos ligantes na superfície do parasita (Rittig & Bogdan, 2000). A interação da forma promastigota com o macrófago envolve o receptor de complemento 1 (CR1) e 3 (CR3) (Kedzierski *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 1989), o receptor de fibronectina (Brittingham *et al.*, 1999) e o receptor manose e fucose (Blackwell *et al.*, 1985). Esses receptores são cruciais no processo de interação e interiorização do parasita pelo macrófago, culminando com a formação do fagossomo, o qual fundindo-se com o lisossomo, origina o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo (Henriques *et al.*, 2003; Antoine *et al.*, 1998). É no vacúolo parasitóforo que o parasita sofre a transformação de promastigota para amastigota, a forma intracelular obrigatória capaz de suportar as condições adversas do novo ambiente. Essas amastigotas multiplicam-se até o ponto em que há o rompimento da membrana dos fagolisossomos com disseminação dessas formas pelos tecidos, as quais infectam novos macrófagos (**Figura 1**).

Noronha e colaboradores (1994 e 1996) descreveram uma proteína de *L. amazonensis* capaz de lisar eritrócitos de várias espécies de mamíferos de maneira similar ao TC-TOX, uma proteína formadora de poro (PFP) descrita para o *T. cruzi* por Norma Andrews (1990). A PFP da *Leishmania*, denominada Leishporina, causa lesão não só em eritrócitos, mas também em células nucleadas como os macrófagos (Almeida-Campos & Horta, 2000; Almeida-Campos *et al.*, 2002). Essa proteína, presente em promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, tem uma atividade ótima em pH 5,0 e a 37°C. A temperatura e o pH necessários para a atividade ótima dessa enzima dão indícios de que a Leishporina deve ser mais efetiva dentro do hospedeiro vertebrado, particularmente no interior do vacúolo parasitóforo (Horta 1997). Em conjunto, esses resultados evidenciam uma participação importante da Leishporina no mecanismo de ruptura do vacúolo parasitóforo e, conseqüentemente, da célula hospedeira.

Estágios no inseto vetor

Estágios no hospedeiro vertebrado

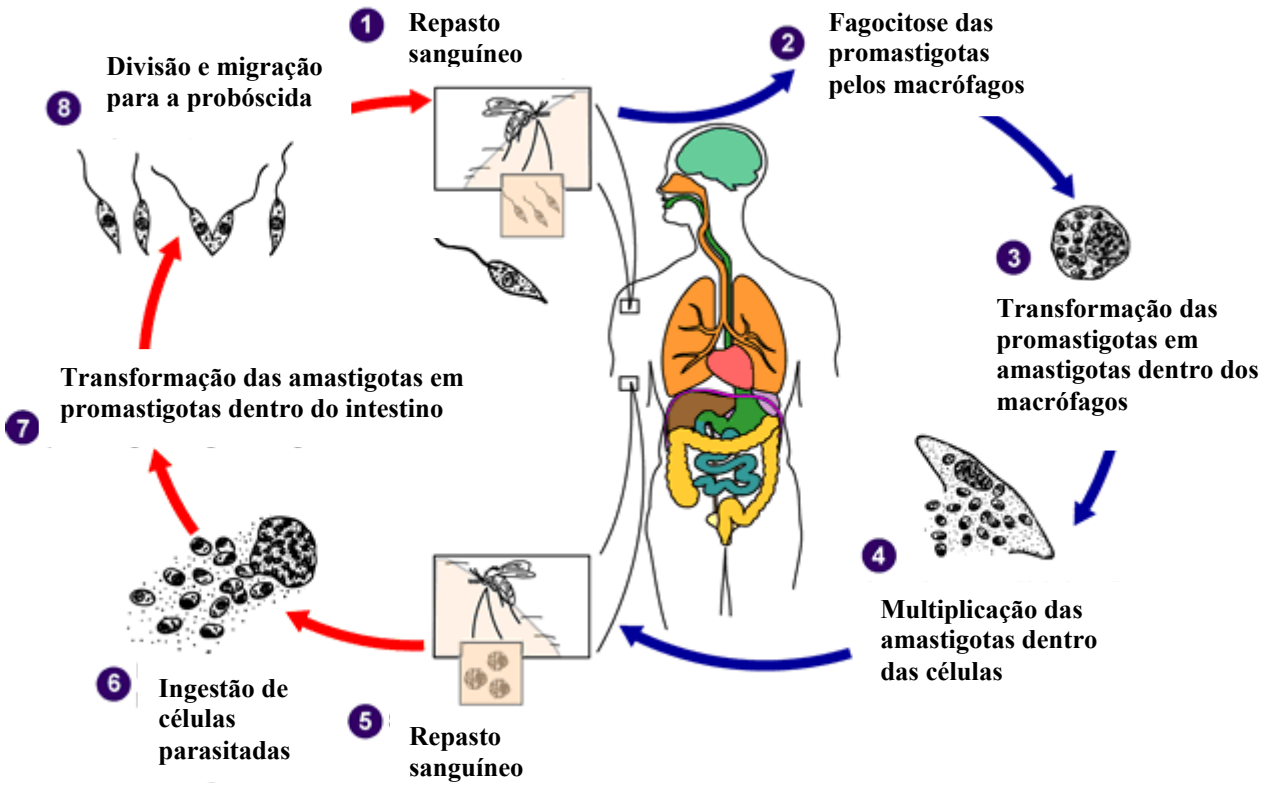


Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* (modificado de DPDx, 2006).

1.3 - Tratamento

O tratamento é um fator importante no controle da letalidade da leishmaniose, sendo um componente essencial na luta contra essa doença. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são compostos de antimônio pentavalente. Dois produtos equivalentes são usados, Glucantime[®] e Pentostan[®], não sendo esse último comercializado no Brasil. Entretanto, ambos apresentam algumas desvantagens, como o regime de tratamento e os efeitos colaterais. A administração do antimônio pentavalente é feita por via intramuscular (i.m.) ou intravenosa (i.v.) durante 20 dias, para o tratamento da leishmaniose cutânea, e durante 28 dias, para o tratamento da forma mucocutânea da doença (Herwaldt & Berman, 1992). Arritmia cardíaca (Chulay *et al.*, 1985), pancreatite (Gasser *et al.*, 1994) e disfunção hepática (Hepburn *et al.*, 1993) são alguns dos efeitos colaterais descritos para esses medicamentos.

Mais recentemente, fármacos alternativos aos antimoniais pentavalentes foram registrados para uso em alguns países. Dentre esses podemos citar:

- Miltefosine: a sua eficácia foi demonstrada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Kuhlencord *et al.*, 1992; Croft *et al.*, 1987) e os achados conduziram à triagem clínica e ao registro desse medicamento na Índia em 2002 e na Colômbia em 2005, para tratamento das formas visceral e cutânea da leishmaniose. O miltefosine tem uma meia-vida longa no organismo e isso pode favorecer o aparecimento de resistência (Bryceson, 2001).

- Paromomicina: a eficácia desse antibiótico contra a leishmaniose foi descoberta em 1960 e atualmente ele é utilizado em ensaios clínicos em casos de leishmaniose visceral ou cutânea. Assim como foi observado com miltefosine (Escobar *et al.*, 2002), a eficácia da paromomicina também está diretamente relacionada com a espécie do parasita (el-On & Hamburger, 1987). A paromomicina foi também avaliada em formulação de gel para uso tópico no tratamento da forma cutânea da doença, com sucesso (Mussi *et al.*, 2007).

- Anfotericina B: esse composto, originalmente desenvolvido como um antifúngico, é tóxico e para amenizar a sua toxicidade ele foi encapsulado em lipossomos (AmBisome[®]) e está registrado para o tratamento da leishmaniose visceral (Meyerhoff, 1999). Apesar de eficiente, o uso do AmBisome[®] está restrito aos países industrializados devido ao seu alto custo.
- Pentamidina: é usada no tratamento da leishmaniose visceral, cutânea ou cutânea difusa. Esse fármaco pode induzir diabetes mellitus e também causar danos irreversíveis nos rins, pâncreas e medula óssea (Markle & Makhoul, 2004).

1.4 - Vacinação

Atualmente, as medidas de controle da leishmaniose envolvem o controle das populações do vetor e a eliminação dos reservatórios domésticos da doença. Na prática, essas medidas se mostraram ineficazes na maioria dos casos e, além disso, elas requerem uma infra-estrutura que a maior parte dos países em desenvolvimento não consegue manter. Assim, o desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz contra as diferentes formas de leishmaniose parece ser a abordagem mais vantajosa.

Em geral, as vacinas em desenvolvimento contra a leishmaniose, assim como contra outras doenças infecciosas, podem ser divididas em três categorias: (i) Vacina viva, incluindo também as construções geneticamente modificadas; (ii) Vacinas de primeira geração, que são aquelas produzidas com frações do agente patogênico ou ainda com o patógeno inteiro e morto, com ou sem adjuvantes e (iii) Vacinas de segunda geração, produzidas com proteínas recombinantes ou DNA (ácido desoxirribonucléico) e vetores microbianos (vírus e bactérias) expressando antígenos do parasita.

O emprego de organismos vivos e virulentos para a imunização contra a leishmaniose, uma técnica denominada leishmanização, é bastante antigo e teve como base a variolização. No século XVIII, a mulher do embaixador britânico na Turquia, Lady Mary Wortley

Montagu, observou que pessoas saudáveis inoculadas com a secreção da pústula de uma pessoa com a doença contraíam, na maioria das vezes, a varíola fraca. Mais tarde, Lady Montagu introduziu a prática de variolização na Europa (Grundy, 2000; Strohl, 1964). Na leishmanização, secreções de lesões eram inoculadas em partes do corpo normalmente cobertas pelo vestuário, na tentativa de se conseguir uma proteção contra lesões na face e em outras partes normalmente expostas do corpo. O uso de material de lesões humanas ou de outros animais foi substituído pelo uso de promastigotas de *L. major* obtidas de cultura (Greenblatt, 1980; Senekji & Beattie, 1941). A leishmanização foi usada em Israel na década de 70 e no Irã nos anos 80 (Nadim *et al.*, 1983), como uma vacina profilática. Essa prática também foi adotada pelo Governo iraniano em um programa que abrangeu cerca de 2 milhões de pessoas, durante a guerra entre o Irã e o Iraque, um conflito que foi de 1980 a 1988. A variabilidade no tamanho e na duração das lesões resultantes da inoculação de cepas virulentas fez com que a técnica fosse abandonada no Irã, após da guerra.

Outra abordagem na busca de uma vacina contra a leishmaniose baseia-se na manipulação gênica e criação de parasitas geneticamente modificados. Nessa estratégia, aqueles genes que são essenciais para a sobrevivência da *Leishmania* no seu hospedeiro são bloqueados, removidos ou mesmo substituídos por outros genes. A primeira construção que gerou um mutante deficiente para um gene deu origem a uma cepa de *L. major knock-out* (KO) para a enzima dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) (Cruz *et al.*, 1991). Os camundongos inoculados com esses mutantes apresentaram uma proteção significativa, mas temporária, após o desafio com os parasitas virulentos (Veras *et al.*, 1999; Titus *et al.*, 1995). Além desse mutante, muitos outros já foram construídos e utilizados na tentativa de se induzir imunidade contra a leishmaniose, a proteção alcançada foi, no entanto, variável (Papadopoulou *et al.*, 2002; Alexander *et al.*, 1998).

No Brasil, o uso de parasitas mortos na tentativa de se induzir uma proteção contra a leishmaniose teve início na década de 40. A partir de 1970, Wilson Mayrink e seus colaboradores na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), desenvolveram uma vacina morta composta de quatro espécies diferentes de *Leishmania* (Genaro *et al.*, 1996). Essa vacina acabou sendo simplificada pelo uso de uma única espécie e está sendo usada aqui no Brasil como um adjuvante durante o tratamento contra a leishmaniose (Machado-Pinto *et al.*, 2002) após ter sido aprovada pelo Ministério da Saúde. Além disso, essa vacina também foi testada na Colômbia (Vélez *et al.*, 2005; Veléz *et al.*, 2000) e no Equador (Armijos *et al.*, 2004). Na Colômbia, os voluntários receberam a vacina pela via i.m. ou ainda a vacina com BCG (bacilo de Calmette-Guérin) pela via intradérmica (i.d.) e foram acompanhados durante 12 meses. Nesse estudo, os ensaios clínicos de fase I e II comprovaram que a vacina é segura e imunogênica (Veléz *et al.*, 2000). Em 2005, Vélez e colaboradores realizaram os ensaios clínicos de fase III com 2.597 soldados colombianos. Um ano após a imunização, a incidência da leishmaniose cutânea no grupo vacinado e controle foi de 7,7 e 6,8 %, respectivamente. No Equador, ensaios clínicos de fase III também demonstraram que essa vacina não foi capaz de diminuir a incidência da leishmaniose em uma área rural endêmica (Armijos *et al.*, 2004).

As vacinas de primeira geração, produzidas com frações do parasita, também já foram empregadas. Uma vacina de subunidade contra a leishmaniose visceral canina, conhecida como Leishmune[®], está sendo produzida e comercializada no Brasil, desde que foi autorizada pelo Ministério da Agricultura em junho de 2003. Essa vacina, constituída pelo ligante de fucose e manose (FML) da *L. donovani* com saponina, induz cerca de 92 a 97 % de proteção contra a leishmaniose visceral zoonótica (Saraiva *et al.*, 2006). A Leishmune[®], apesar de eficaz, traz um risco para a população, pois tanto o cão que recebeu a vacina como o que foi infectado naturalmente, se tornam soropositivos, dificultando a distinção entre o animal vacinado e o infectado assintomático.

Desde que a prática de leishmanização foi abandonada no Irã, os pesquisadores locais se dedicaram à produção de uma vacina composta por *L. major* autoclavada associada ao BCG. Em 1996, Bahar e colaboradores avaliaram a segurança e a imunogenicidade dessa vacina e, após a análise dos dados, os autores do trabalho revelaram que a vacina é segura e que 50% dos indivíduos vacinados produziam alguma resposta imunológica. A vacina foi testada profilaticamente em 3.637 crianças em idade escolar (Sharifi *et al.*, 1998) e em 2.453 pessoas com idade entre 5 e 72 anos (Momeni *et al.*, 1999) e uma diminuição na incidência da doença foi observada apenas durante o primeiro ano após a vacinação. Após esse período, a incidência da leishmaniose não era estatisticamente diferente entre o grupo vacinado e o grupo controle. Essa vacina também foi testada no Sudão contra a leishmaniose visceral e os resultados não foram animadores (Khalil *et al.*, 2000).

Após os estudos citados acima, os pesquisadores concluíram que a vacina composta por *L. major* autoclavada associada ao BCG não era suficientemente imunogênica e que outro adjuvante deveria ser considerado. Dessa forma, buscando aumentar a imunogenicidade, a vacina foi adsorvida em hidróxido de alumínio e a nova fórmula foi avaliada em macacos Langur (Misra *et al.*, 2001), cães (Mohebbali *et al.*, 2004) e em voluntários humanos saudáveis (Khalil *et al.*, 2005). Os macacos Langur eram vacinados com a preparação de *L. major* autoclavada precipitada em hidróxido de alumínio + BCG e avaliados durante 180 dias, após o desafio com *L. donovani*. Um dos animais vacinados morreu após 130 dias de infecção e sete apresentaram uma cura completa no final do experimento (Misra *et al.*, 2001). Essa mesma preparação mostrou uma eficácia de 69,2 %, após um estudo profilático envolvendo 347 cães. Dezesesseis meses após a imunização, os cães foram avaliados através de testes sorológicos e a razão de incidência da doença foi de 3,7 % nos animais vacinados e 12 % nos animais controles (Mohebbali *et al.*, 2004). O estudo realizado com os voluntários humanos saudáveis revelou que essa vacina é bem tolerada e induz uma reação de hipersensibilidade

tardia, após a injeção i.d. de promastigotas de *L. major* mortas nos indivíduos previamente imunizados. Além disso, as células mononucleares do sangue periférico desses indivíduos produzem uma alta quantidade de interferon- γ (IFN- γ) quando estimuladas com antígenos de *L. donovani* (Khalil *et al.*, 2005).

Na construção das vacinas de segunda geração, muitos antígenos de *Leishmania* já foram utilizados. A região codificadora para a parte protéica de uma glicoproteína da superfície da *Leishmania* com peso de 63 kDa, conhecida como gp63, foi a primeira vacina de plasmídeo produzida contra a leishmaniose (Xu & Liew, 1994). Resultados conflitantes foram relatados em modelos experimentais usando a gp63 purificada e diferentes adjuvantes (Rivier *et al.*, 1999). Em 1995, Olobo e colaboradores imunizaram macacos Vervet com gp63 recombinante e apenas uma proteção parcial foi alcançada, após o desafio com as promastigotas virulentas de *L. major*. Com relação ao antígeno LACK (*Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*), enquanto cães vacinados com vetores do vírus da vaccinia expressando esse antígeno apresentaram 60 % de proteção contra a leishmaniose visceral causada pela *L. infantum* (Ramiro *et al.*, 2003), camundongos BALB/c vacinados com DNA do LACK não foram protegidos contra a infecção pela *L. chagasi* (Marques-da-Silva *et al.*, 2005).

Os estudos de vacinação contra a leishmaniose visceral são bastante reduzidos, quando comparados aos estudos dedicados ao desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose cutânea. Porém, as cisteíno-proteinases (CPs) (Rafati *et al.*, 2006), os antígenos HASPB1 (*hydrophilic acylated surface protein B1*) (Stager *et al.*, 2000) e LCR1 (*antigen cloned from amastigote L. chagasi library*) (Streit *et al.*, 2000) e uma proteína específica da forma amastigota denominada A2 (Ghosh *et al.*, 2002) se mostraram eficientes na indução de imunidade contra a forma visceral da doença, quando usados como vacinas de segunda geração.

As histonas de *Leishmania* também são importantes imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina. Camundongos BALB/c foram imunizados com uma mistura de quatro DNAs de plasmídeos codificando as histonas H2A, H2B, H3 e H4 de *L. infantum* e avaliados durante 10 semanas, após o desafio com promastigotas de *L. major* (Iborra *et al.*, 2004). No final do experimento, 67 % dos animais vacinados não apresentaram nenhuma lesão. Por outro lado, a imunização com a histona H1 recombinante não foi suficiente para proteger macacos Verdes Africanos contra a infecção por *L. major* (Masina *et al.*, 2003).

A predisposição genética e a resposta imune de cada indivíduo em uma população indicam que uma vacina contra a leishmaniose deveria ser composta por vários antígenos e não apenas por uma molécula em particular. Esse foi o racional proposto para uma vacina constituída de uma poliproteína recombinante, obtida da fusão de três genes pelo grupo do *Infectious Disease Research Institute*, de Seattle. Essa vacina, denominada Leish-111f, é formada pelos antígenos TSA (*thiol-specific antioxidant*), LeIF (*Leishmania elongation initiation factor*) e LmSTI1 (*Leishmania major stress-inducible protein 1*) em combinação com o adjuvante MPL[®]-SE (*monophosphoryl lipid A plus squalene*). Esses pesquisadores observaram que camundongos BALB/c imunizados com a poliproteína se mostravam resistentes à leishmaniose cutânea, por pelo menos três meses (Coler *et al.*, 2002). Eles demonstraram, agora em colaboração com pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, que cães da raça beagle vacinados com essa preparação e desafiados com *L. chagasi*, apresentaram uma relação de anticorpos IgG (imunoglobulina G)₂/IgG₁ cerca de 40 vezes superior aos controles (Fujiwara *et al.*, 2005).

Apesar da extensa lista de trabalhos com resultados promissores citados acima, ainda não existe nenhuma vacina aprovada para uso humano contra as várias formas da leishmaniose. Em geral, as vacinas que se mostram eficazes em experimentos com animais

empregam adjuvantes não compatíveis com o uso em humanos. Por isso, novas estratégias de vacinação continuam sendo propostas e desenvolvidas.

1.5 - Fatores de resistência e suscetibilidade do hospedeiro na leishmaniose

A infecção causada por *L. major* pode ser fatal, dependendo da linhagem do camundongo hospedeiro. Camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem uma infecção grave e progressiva, enquanto muitas outras linhagens de camundongos, incluindo C3H/HeN, apresentam uma única lesão no sítio de inoculação do parasita (Scott, 1991). A diferença entre as linhagens resistentes e suscetíveis de camundongos parece depender da natureza da resposta das células T CD4+. As células T CD4+ podem ser divididas em dois subgrupos, *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2), de acordo com as citocinas produzidas. As células com característica Th1 produzem a interleucina-2 (IL-2) e o IFN- γ , enquanto as células com fenótipo Th2 produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) (Mosmann & Coffman, 1989).

Já está bem estabelecido que uma resposta imune protetora contra a leishmaniose depende do desenvolvimento de uma resposta primariamente Th1. O consenso é que a interleucina-12 (IL-12) produzida pelos macrófagos e/ou células dendríticas (DCs) infectados direciona a diferenciação e a proliferação das células Th1. Apenas a apresentação dos antígenos da *Leishmania* pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) através do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II não é suficiente para estimular as respostas das células Th1. Outro pré-requisito é a ligação das moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2 e de adesão CD40, presentes nas APCs, com os seus respectivos ligantes CD28 e CD40L, nas células T (Brodskyn *et al.*, 2001). Os linfócitos Th1 ativados produzem IFN- γ e subseqüentemente ativam os macrófagos. Os macrófagos são as primeiras células hospedeiras para a *Leishmania* e a ativação desses fagócitos é o primeiro mecanismo para a eliminação desses parasitas. Algumas evidências apontam para dois metabólitos produzidos pelos

macrófagos como essenciais no controle da infecção por *Leishmania*. Durante os primeiros estágios da infecção, o ânion superóxido (O_2^-) é produzido pelos macrófagos humanos e murinos em resposta a fagocitose (Murray, 1982; Haidaris & Bonventre, 1982). O outro metabólito produzido pelos macrófagos é o óxido nítrico (NO) (Evans *et al.*, 1993). Diferente do O_2^- , que é gerado durante a fagocitose do parasita, o NO é produzido após a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ .

Durante a infecção por *L. major*, os camundongos C57BL/6 apresentam uma resposta Th1, e isso culmina com a morte do parasita e o eventual controle da infecção. Por outro lado, camundongos da linhagem BALB/c reagem preferencialmente com uma resposta Th2, que acaba resultando no desenvolvimento de lesões que não cicatrizam (**Figura 2**). Foi demonstrado que a suscetibilidade da linhagem BALB/c está relacionada com a expansão de células T CD4+ com receptor de antígeno de célula T (TCR) V β 4V α 8. Essa expansão, dependente do antígeno LACK de *L. major*, faz com que essas células produzam IL-4 que atua diminuindo a expressão da cadeia β 2 do receptor de IL-12 das células T (Himmelrich *et al.*, 1998). Além de contribuir para a infecção latente e imunidade, a produção de IL-10 pelas células T regulatórias (Treg) pode também ser fundamental para a manutenção de uma resposta imunológica não protetora (Belkaid *et al.*, 2006; Peters & Sacks, 2006; Sacks & Anderson, 2004).

A resistência e suscetibilidade dessas duas linhagens de camundongos dependem também do *background* genético do hospedeiro (Foote & Handman, 2005). Alguns *loci* nos cromossomos 6, 7, 10, 11, 15 e 16 estão associados com resistência à leishmaniose, demonstrando a natureza multigênica desse fenótipo (Beebe *et al.*, 1997). Além das células T CD4+, as células T CD8+ também exercem um papel protetor na leishmaniose.

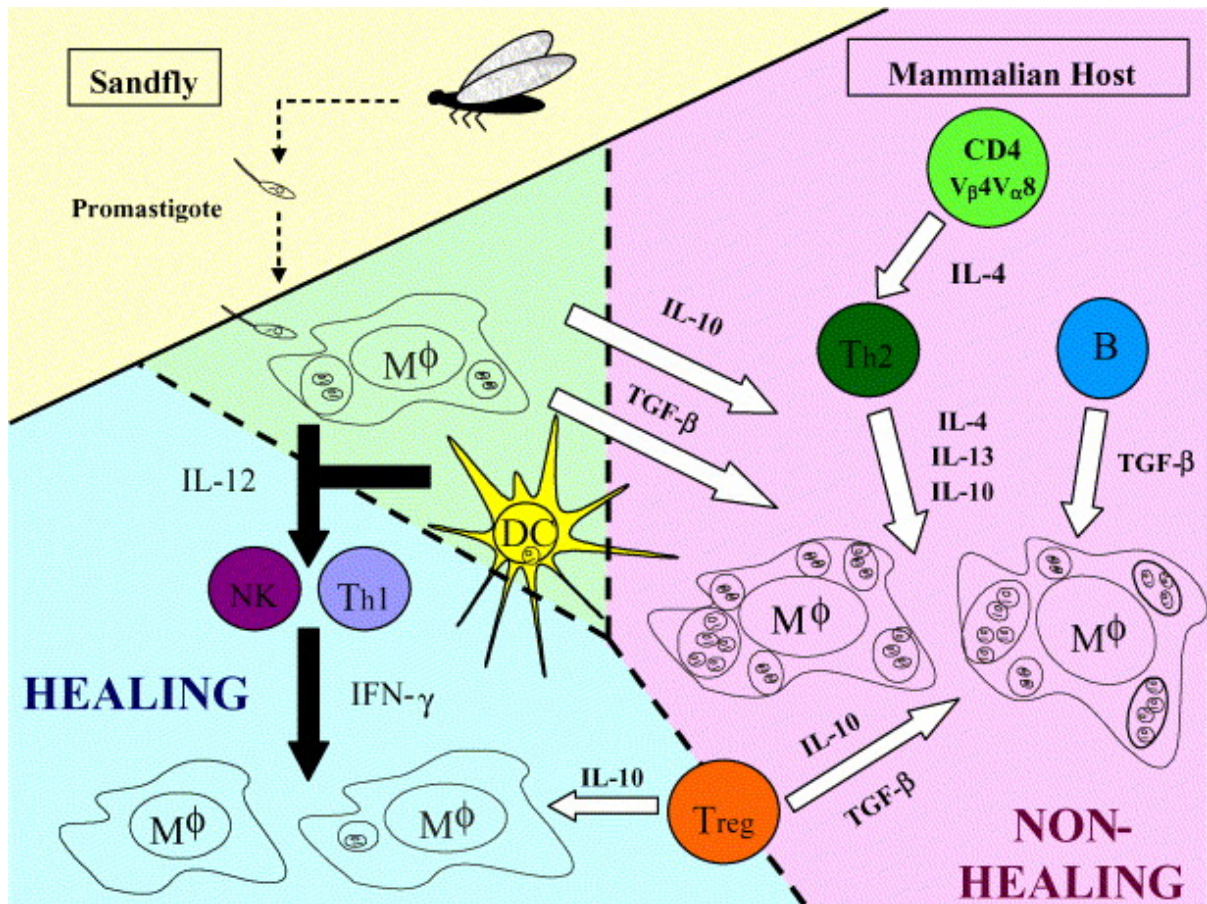


Figura 2 - *Leishmania major*: resposta imunológica protetora e não protetora (modificado de Alexander & Bryson, 2005). Durante uma resposta protetora, a produção de IL-12 pelas células infectadas induz a ativação das células NK (*natural Killer*) e a diferenciação das células Th1 e produção de IFN- γ . A morte do parasita ocorre após a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ que estimula a produção de NO nas células infectadas. A falha na expressão de IL-12 ou alternativamente a produção de IL-4 resulta na replicação do parasita dentro das células infectadas. Essa replicação descontrolada ainda é facilitada pela produção de IL-10 pela célula hospedeira.

Isto ocorre tanto após uma infecção primária com uma baixa quantidade de *L. major* (Belkaid *et al.*, 2002), como durante uma infecção secundária com o mesmo parasita (Muller *et al.*, 1994).

Outras espécies de *Leishmania*, em particular a *L. amazonensis* ou a *L. mexicana*, estão associadas com padrões de doença completamente diferentes, após a infecção. Por exemplo, C57BL/6 ou C3H/HeN, que se curam após uma infecção com *L. major*, desenvolvem lesões crônicas quando infectados com *L. amazonensis* ou *L. mexicana*. Há diferenças nos fatores de virulência dos parasitas pertencentes ao complexo *L. (L.) mexicana* em comparação com a *L. major* e esses fatores afetam tanto a patologia como os mecanismos imunes associados com a doença. Alguns estudos indicam que a CPB é um importante fator de virulência para os parasitas pertencentes ao complexo *L. (L.) mexicana* (Denise *et al.*, 2003).

Outros fatores de virulência são expressos por algumas, mas não por todas as espécies de *Leishmania*. Por exemplo, o antígeno A2 é um fator de virulência expresso em *L. donovani* e nas espécies do complexo *L. (L.) mexicana*, mas não em *L. major* (Zhang *et al.*, 2003). Já o antígeno gp46, uma glicoproteína da superfície da *Leishmania* com peso de 46 kDa, é expresso por *L. major*, *L. donovani* e por todas as espécies do complexo *L. (L.) mexicana* e não é expresso em *L. panamensis* ou *L. braziliensis* (McMahon-Pratt *et al.*, 1992). O lipofosfoglicano (LPG) é um fator de virulência para *L. major* (Spath *et al.*, 2000) e *L. donovani* (McNeely & Turco, 1990) e não o é para a *L. mexicana* (Ilg, 2000). Essas moléculas microbianas específicas podem induzir as células apresentadoras de antígenos a direcionar ou não uma resposta imune protetora contra a *Leishmania* (Manickasingham *et al.*, 2003).

Como mencionado, a resposta imune protetora contra a *Leishmania* é dependente de uma resposta Th1 e, conseqüentemente, da produção de IFN- γ . Já o papel das citocinas de padrão Th2 na suscetibilidade é duvidoso. A IL-4, por exemplo, pode exercer um papel

protetor durante a infecção com *L. donovani* (Stager *et al.*, 2003). Em 2001, Biedermann e colaboradores demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com IL-4, antes e oito horas após a infecção com *L. major*, é capaz de induzir uma resposta Th1 nesses animais.

O papel das citocinas de padrão Th2 na exacerbação da leishmaniose também está diretamente relacionado com a espécie da *Leishmania*. Camundongos C57BL/6 deficientes para IL-4, tratados ou não com IL-12 exógeno, permanecem suscetíveis à infecção por *L. amazonensis* (Jones *et al.*, 2000). Nesse trabalho, os autores também demonstraram que a administração de IL-12 não é suficiente para induzir a cura de camundongos da linhagem C3HeB/FeJ infectados com essa mesma espécie de *Leishmania*. Em 2002, Jones e colaboradores demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes para IL-10 não conseguem controlar a infecção causada por *L. amazonensis*. O tamanho da lesão desses animais e dos camundongos tipo selvagem (WT) foi similar após um inóculo de $5,0 \times 10^6$ parasitas. Camundongos da linhagem BALB/c, deficientes para IL-10 ou WT, também apresentaram lesões similares durante todo o curso de infecção com *L. amazonensis*. (Padigel *et al.*, 2003).

1.6 - Os lipossomos

Certamente, as vacinas produzidas com frações dos patógenos são mais seguras do que as vacinas feitas com organismos vivos e atenuados, porém elas têm uma baixa imunogenicidade, que pode ser compensada pelo uso de um adjuvante. Basicamente, os adjuvantes descritos até 1995 são irritantes que estimulam uma forte reação inflamatória no local que foi injetado, criando um efeito de depósito. Com o novo paradigma de subpopulações de linfócitos T, ficou evidente que para cada vacina é necessário um tipo particular de adjuvante, que induza preferencialmente uma resposta Th1 ou Th2. Os dois únicos adjuvantes aprovados para uso em humanos, o hidróxido de alumínio e uma emulsão

de óleo em água (MF59), induzem uma potente resposta humoral (Del Giudice *et al.*, 2001), menos importante na imunidade protetora à leishmaniose.

Em 1974, Allison e Gregoriadis descreveram o uso dos lipossomos como adjuvantes imunológicos. Os lipossomos são vesículas formadas por camadas lipídicas, delimitando um compartimento aquoso. Eles possuem importantes vantagens como imunoadjuvantes: são biodegradáveis, não são tóxicos e tem a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*). Além da resposta de células T CD4+, os lipossomos podem instruir uma resposta dos linfócitos T citotóxicos (Chikh & Schutze-Redelmeier, 2002).

Muitos protocolos de vacinação contra a leishmaniose experimental utilizando lipossomos como adjuvantes podem ser encontrados na literatura e muitos deles apresentam resultados animadores. Camundongos BALB/c imunizados com o antígeno LmSTII recombinante encapsulado em lipossomos apresentaram uma proteção significativa ao desafio com *L. major* (Badiee *et al.*, 2007). Recentemente, o antígeno gp63 recombinante também foi reconstituído em lipossomos e uma proteção de 73 % foi observada doze semanas após o desafio dos camundongos com *L. major* (Jaafari *et al.*, 2006).

Esses trabalhos demonstram que um aprimoramento no desenvolvimento dos lipossomos e a escolha correta dos antígenos fazem desses sistemas vesiculares candidatos promissores como adjuvantes para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose.

O objetivo principal deste trabalho foi empregar lipossomos como carreadores de proteínas antigênicas da forma amastigota de *L. amazonensis* e, posteriormente, verificar se esses proteolipossomos apresentavam a propriedade de proteger camundongos isogênicos contra a leishmaniose cutânea experimental.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema carreador de proteínas antigênicas da forma amastigota de *L. amazonensis*, empregando-se lipossomos, na perspectiva de ser usado como um imunógeno. Para isso, camundongos isogênicos foram inoculados com os proteolipossomos gerados e desafiados com promastigotas de *L. amazonensis*.

2.2 - Objetivos específicos

1. Obter um extrato bruto da forma amastigota de *L. amazonensis* e verificar a imunogenicidade das proteínas presentes neste extrato.
2. Definir o detergente de melhor rendimento no processo de solubilização das proteínas de membrana presentes no extrato bruto.
3. Otimizar as condições de solubilização dessas proteínas de membrana empregando-se apenas um detergente.
4. Reconstituir em lipossomos as proteínas solubilizadas presentes no extrato bruto e caracterizar bioquimicamente os proteolipossomos.
5. Avaliar a capacidade de proteção de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 contra a leishmaniose cutânea experimental após a imunização com os proteolipossomos.
6. Verificar a importância *in vivo* de IFN- γ e IL-12 na proteção induzida pelos proteolipossomos através da utilização de camundongos C57BL/6 deficientes para estas citocinas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 com idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Biotério de Criação de Camundongos Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Também foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 *knock-out* para IFN- γ (IFN- γ KO) ou para IL-12 (IL-12 KO) gentilmente cedidos pelo Dr. João Santana da Silva do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais KO foram protegidos por barreiras ambientais em estantes especiais e receberam água e alimento estéreis.

3.2 - Parasitas

Os parasitas utilizados no presente trabalho foram amastigotas e promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, cuja cultura original foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Norma Mello do Departamento de Parasitologia do ICB da UFMG.

3.3 - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* foi o meio Schneider (Sch) (Sigma, USA) contendo sulfato de gentamicina (Ducto, Brasil) na concentração final de 50 mg/L e 10 % de soro fetal bovino (SFB) (HyClone, USA) previamente inativado a 56°C por 30 minutos. Esse meio, denominado em nosso laboratório de Sch/SFB, foi esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 μ m (Sartorius, Alemanha).

3.4 - Obtenção e cultivo dos parasitas

A cultura inicial foi obtida de camundongos BALB/c previamente inoculados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* em uma das patas traseiras pela via subcutânea (s.c.). Depois de 2 meses de infecção, os animais foram sacrificados e as patas infectadas foram retiradas e mantidas em álcool para a remoção da pele necrosada. Em seguida, as patas foram maceradas em meio Sch/SFB e as amastigotas de *L. amazonensis* presentes nas células das patas foram isoladas e colocadas em meio Sch/SFB, onde se transformavam em promastigotas.

Para a propagação *in vitro* das promastigotas, uma alíquota de parasitas no sexto dia de cultivo foi contada com o corante eritrosina B (Merck, Alemanha) 0,04 % em câmara hemocitométrica tipo Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha) em microscópio óptico com aumento de 400x. Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas em 1 mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

Número de parasitas = média dos 4 quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10^4

Após a realização dos cálculos, 5×10^5 promastigotas/mL foram inoculadas em meio Sch/SFB, preparado como descrito anteriormente. Os parasitas foram mantidos a 25°C e repicados por sucessivas passagens, até um máximo de 12 passagens.

3.5 - Preparação do soro contendo os anticorpos contra os determinantes imunogênicos de *L. amazonensis*

Camundongos BALB/c foram infectados pela via s.c. em uma das patas traseiras com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Dois meses após a infecção, o sangue dos animais foi coletado por via retroorbital para a obtenção do soro contendo os anticorpos contra os determinantes imunogênicos do parasita.

3.6 - Preparação do extrato bruto de amastigotas de *L. amazonensis*

As amastigotas isoladas como descrito no item 3.4 foram centrifugadas a 1.200 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão Tris [(*hydroxymethyl*)-*aminomethane*]-HCl (ácido clorídrico) (5 mM, pH 7,5) contendo 1 mM EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), 1,6 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), 0,1 mM E-64 [*trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido*-(4-*guanidino*)*butane*] e 1mM 1,10-fenantrolina (Sigma, USA). A suspensão foi sonicada a 4°C com um sonicador de ponta com 3 pulsos de 30 segundos a 60 W.

3.7 - Solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* empregando-se diferentes detergentes

Para solubilizar as proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*, alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto preparado como descrito no item 3.6 foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes detergentes, tais como: CHAPS {3-[(3-*Cholamidopropyl*)*dimethylammonio*]-1-*propanesulfonate*} 0,4 %, CHAPSO {3-[(3-*Cholamidopropyl*)*dimethylammonio*]-2-*hydroxy-1-propanesulfonate*} 0,3 %, Tween 20 (*polyoxyethylenesorbitan monolaurate*) 1 %, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1 % e Polidocanol (*polyoxyethylene 9-lauryl ether*) 5 % (Sigma, USA). As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora e a porcentagem de proteína solúvel foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16.

3.8 - Estudo das condições ótimas de solubilização, conforme descrito por Santos e Ciancaglini (2000):

Após a escolha dos detergentes mais eficientes na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* presentes no extrato bruto, foram realizados

experimentos para otimizar esse processo. Nesses ensaios alguns parâmetros foram variados e, posteriormente, analisados:

3.8.1 - O efeito da concentração do detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

Alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes concentrações de Polidocanol e SDS. As concentrações de Polidocanol variavam de 5 a 10 % e a do SDS de 0,05 a 1 %. Após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora, a porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16.

3.8.2 - O efeito da concentração da proteína na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

Diferentes concentrações protéicas do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com SDS 0,1 %. Após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora, a porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16.

3.8.3 - O efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

Alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas com SDS 0,1 % por 0, 30, 60 e 120 minutos, tanto a temperatura ambiente como a 4°C. Após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora a 4°C, a porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16.

3.9 - Eletroforese em condição desnaturante [SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)]

O peso molecular das proteínas foi determinado pelo método descrito por Laemmli (1970). Resumidamente, 5 % de poliacrilamida foi utilizado no gel de empilhamento e 10 % no gel de separação. As amostras tratadas, conforme descrito pelo método, foram levadas ao banho-maria a 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Para se determinar a mobilidade relativa de cada proteína foi aplicado em cada gel o padrão de peso molecular da Sigma (USA) ou da Fermentas (USA) ou ainda uma mistura contendo três proteínas [soro albumina bovina (BSA) (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (31 kDa)]. O padrão de peso molecular da Sigma (USA) era constituído pelas seguintes proteínas: miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). As seguintes proteínas constituíam o padrão de peso molecular da Fermentas (USA): β -galactosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase *Bsp98I* (25 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisosima (14,4 kDa).

3.10 - Coloração pela prata

Para a visualização das proteínas fracionadas no SDS-PAGE, o gel foi corado pela prata segundo o método descrito por Blum e colaboradores (1987). Após a corrida, o gel foi fixado por 24 horas com uma solução de 100 mL composta de metanol 50 %, ácido acético 12 % e 50 μ L de formaldeído. Após a fixação, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50 %, sendo de 20 minutos cada lavagem. Posteriormente, o gel foi tratado com tiosulfato de sódio 0,02 % por 2 minutos. Após 3 lavagens com água deionizada, o gel foi incubado durante 20 minutos em 100 mL de uma solução de prata 0,1 % contendo 75 μ L de formaldeído. O gel foi lavado novamente com água deionizada e incubado com 100 mL da solução reveladora

(carbonato de sódio 3 %, tiosulfato de sódio 0,0002 % e 75 µL de formaldeído) até a visualização das bandas. Após a parada da reação com metanol 50 % e ácido acético 12 %, o gel foi embebido em uma solução de metanol 50 % durante 20 minutos, montado e fotografado.

3.11 - *Western Blotting*

As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em condição desnaturante como descrito no item 3.9 e transferidas por corrente elétrica para membranas de nitrocelulose (Gibco, USA). Após a transferência feita sob voltagem constante de 100 V a 4°C por 1 hora, a membrana foi corada com Ponceau S 0,5 % para a visualização das bandas protéicas e marcação do padrão de peso molecular. O corante foi retirado através de lavagens sucessivas com água deionizada e a membrana bloqueada com tampão de bloqueio [PBS (salina tamponada com fosfato)/Tween 20 0,05 % contendo 5 % de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil)] por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05 %) e incubada durante 1 hora com o soro preparado como descrito no item 3.5 diluído 1:75 em tampão de bloqueio. A membrana foi lavada com tampão de lavagem e incubada por 1 hora com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, USA) diluído 1:1000 em tampão de lavagem. Após várias etapas de lavagem, a membrana foi revelada com 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, USA) na concentração de 0,5 mg/mL. Assim, as bandas protéicas imunogênicas foram visualizadas e as suas massas moleculares determinadas por correlação com o padrão revelado previamente com Ponceau S (Sigma, USA).

3.12 - Preparação dos proteolipossomos e lipossomos

Os proteolipossomos foram preparados pelo método de co-solubilização de lipídeos, proteína e detergente. Na preparação, 10 mg de lipídeos foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio, o qual foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução até sua completa evaporação. O filme de lipídeos formado nas paredes do recipiente foi mantido a vácuo por 1 hora para garantir a completa secagem do meio. Posteriormente, os lipídeos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5) contendo 25 mg/mL de SDS e mantidos por 1 hora a 60°C com agitações em intervalos de aproximadamente 10 minutos. Os lipídeos solubilizados foram sonicados por 2 minutos a 240 W com um sonicador de ponta e em seguida foram mantidos em repouso por 1 hora. Após esse período, a solução foi incubada durante 45 minutos com 0,5 mg do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 %.

Para promover a remoção do detergente da suspensão foi utilizada a resina hidrofóbica Calbiosorb[®] na proporção de 200 mg para cada mililitro de amostra com 3 trocas, duas a cada 2 horas e uma *overnight*. As duas primeiras incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação constante e a última foi realizada a 4°C. Após a decantação da resina, a suspensão foi coletada e centrifugada a 140.000 x g por 1 hora a 4°C. O *pellet*, constituído dos proteolipossomos, foi ressuspense em tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5).

A preparação dos lipossomos, na ausência de proteínas, foi realizada empregando-se a mesma metodologia, porém no lugar da adição de 0,5 mg de proteína à suspensão foi acrescentado o tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5) contendo 0,1 % de SDS para manter a mesma relação lipídeo:detergente.

Na preparação dos proteolipossomos foram utilizados dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS) e colesterol (Sigma, USA) nas seguintes razões em massa:

- 1) 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol
- 2) 10 mg DPPC
- 3) 5 mg DPPC:5 mg DPPS
- 4) 1 mg DPPC:1 mg DPPS:5 mg colesterol

Quando os proteolipossomos foram preparados utilizando-se a última razão em massa, a concentração protéica do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % utilizada na preparação foi de 0,35 mg.

Na preparação dos lipossomos foi utilizada somente a primeira combinação descrita acima.

3.13 - Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico

As medidas de distribuição de tamanho dos proteolipossomos foram realizadas empregando-se o equipamento Zetasizer 3000HS_A (Malvern Instruments Ltda, Inglaterra).

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Browniano.

3.14 - Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra (sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 %, proteolipossomos ou lipossomos) foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose de 1 a 30 % em tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5) com uma densidade variando de 1,0381 a 1,1764 g/cm³. Após a ultracentrifugação a 180.000 x g por 4 horas a 25°C, o tubo foi perfurado e acoplado a um coletor calibrado para coletar frações de 0,5 mL. De cada fração foram retiradas alíquotas para serem analisadas quanto à concentração de proteína pelo

método de Read e Northcote (1981) e concentração de fosfato inorgânico oriundo da hidrólise dos fosfolipídeos, conforme descrito nos itens 3.16 e 3.17, respectivamente. A concentração de sacarose foi determinada por refratometria.

3.15 - Avaliação da concentração de lipídeos

A constituição lipídica dos proteolipossomos e lipossomos foi determinada por cromatografia em camada delgada (TLC), depois do tratamento das amostras com clorofórmio:metanol (1:1). A placa de sílica para TLC (Sigma, USA) foi ativada a 100°C por 2 horas e posteriormente as amostras foram aplicadas. Após a secagem das amostras, a placa foi submetida a dois solventes, na mesma direção. O solvente primário foi preparado com clorofórmio:metanol:amônia (65:35:5) e o secundário com clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água (10:2:4:2:1). Após a cromatografia, os lipídeos foram detectados com vapores de iodo. As manchas, correspondentes a cada lipídeo, foram marcadas e a placa ficou descoberta até a descoloração total. A sílica, correspondente a cada mancha, foi raspada e o lipídeo foi extraído utilizando-se clorofórmio. Os fosfolipídeos e o colesterol foram quantificados pelos métodos descritos nos itens 3.17 e 3.18, respectivamente.

3.16 - Dosagem de proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2 % utilizando-se BSA como padrão.

Para a determinação da concentração de proteína das frações do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % ou dos proteolipossomos, coletadas após a centrifugação em gradiente de sacarose, foi empregado o método descrito por Read e Northcote (1981), utilizando-se também BSA como padrão.

3.17 - Dosagem de fosfato inorgânico

O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise dos fosfolipídeos foi quantificado utilizando-se o procedimento descrito por Chen e colaboradores (1956). Aliquotas de 200 µL da amostra foram digeridas com 0,5 mL de ácido nítrico 65 % a temperatura de 120°C até a completa secagem. Em seguida, as aliquotas foram ressuspensas em 0,5 mL de água destilada e misturadas com 1,0 mL do reagente (1 parte de ácido ascórbico 10 % para 6 partes da solução de molibdato de amônio 3,4 mM e ácido sulfúrico 0,45 mM). Em seguida, as amostras foram mantidas por 20 minutos em banho-maria a 45°C e submetidas à análise espectrofotométrica, utilizando-se um comprimento de onda de 820 nm. A determinação da concentração de fosfato inorgânico foi estimada a partir da regressão linear dos valores obtidos.

Para a obtenção da curva padrão, foram utilizadas concentrações de 5 a 80 nM de fosfato preparado a partir de uma solução estoque de dihidrogênio fosfato de sódio 1,0 mM.

3.18 - Dosagem de colesterol

As concentrações de colesterol foram determinadas pelo método descrito por Higgins (1987), utilizando-se como padrão uma solução de colesterol 0,01 % em ácido acético glacial.

Após a completa secagem das aliquotas através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução foi adicionado 1,5 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de uma solução constituída de cloreto de ferro hexa-hidratado 2,5 % em ácido ortofosfórico 85 % diluído 12,5 vezes em ácido sulfúrico concentrado. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram submetidas à análise espectrofotométrica utilizando-se um comprimento de onda de 550 nm.

3.19 - Imunização de camundongos com os proteolipossomos e avaliação da proteção contra a infecção com *L. amazonensis*

Grupos de cinco animais foram imunizados com tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5), lipossomos, sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % ou proteolipossomos. Após duas ou três semanas, os animais foram desafiados com as promastigotas de *L. amazonensis* da fase estacionária de crescimento. O desafio foi feito por via s.c. na pata traseira direita de cada um dos camundongos e o tamanho da lesão foi avaliado semanalmente e/ou quinzenalmente, durante todo o experimento. As patas traseiras dos animais foram medidas com o auxílio de um paquímetro de resolução 0,02 mm (Starrett, cat. # 125MEA-6/150, Brasil) e o tamanho da lesão foi calculado pela diferença de tamanho entre a pata direita e a pata esquerda. O tamanho da lesão foi representado pela média \pm SE das diferenças obtidas em cada camundongo. Alguns parâmetros foram variados durante o experimento de imunização:

1. Linhagem de camundongo: BALB/c e C57BL/6.
2. Via de imunização: s.c. e intraperitoneal (i.p.).
3. Concentração dos proteolipossomos: 10, 20, 40, 80 e 120 μ g.
4. Quantidade de promastigotas de *L. amazonensis* utilizada no desafio: 10^4 , 10^5 e 10^6 .

Para que o sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % fosse utilizado nesse ensaio, a retirada do detergente se fez necessário. Para tal, cada mililitro da suspensão foi incubado duas vezes com 62 mg da resina Calbiosorb[®], por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação constante.

3.20 - Avaliação *in vivo* do papel de IFN- γ e IL-12 na proteção induzida pelos preteolipossomos contra a leishmaniose cutânea experimental

Grupos de quatro camundongos da linhagem C57BL/6 (WT, IFN- γ KO ou IL-12 KO) foram imunizados por via i.p. com tampão ou 40 μ g de preteolipossomos. Após três semanas, os animais foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* da fase estacionária de crescimento. O tamanho da lesão foi calculado como descrito no item anterior.

4 - RESULTADOS

4.1 - O efeito de diferentes detergentes na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

As formas amastigotas do parasita isoladas, conforme descrito no item 3.4 de Material e Métodos, foram submetidas ao processo de sonicação utilizando-se uma potência de 60 W e 3 pulsos de 30 segundos. Esse processo, seguido de centrifugação a 100.000 x g durante 1 hora, foi responsável pela liberação de 44 % de proteínas solúveis no sobrenadante. Já o *pellet*, rico em frações de membrana, continha 56 % das proteínas.

Como a análise por *Western Blotting* revelou a presença de proteínas imunogênicas, tanto nas frações de membrana como no sobrenadante (resultados não mostrados), a solubilização das proteínas de membrana dos parasitas foi feita na presença das proteínas solúveis. Dessa forma, o extrato bruto não foi submetido à centrifugação a 100.000 x g durante 1 hora para a recuperação das frações de membrana e eliminação das proteínas solúveis antes do tratamento com o detergente.

Com o objetivo de se escolher o detergente mais eficiente na solubilização das proteínas de membrana, alíquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas a temperatura ambiente com diferentes detergentes, tais como: CHAPS 0,4 %, CHAPSO 0,3 %, Tween 20 1 % , SDS 0,1 % e Polidocanol 5 %. A **Figura 3** mostra a porcentagem de proteína solubilizada para cada um dos detergentes testados, após a incubação das alíquotas por 2 horas. Como podemos observar, o SDS foi o detergente mais eficiente na solubilização das proteínas de membrana, resultando em uma recuperação de 93 % de proteínas solúveis, após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. Por outro lado, o rendimento de proteínas solúveis foi em torno de 57 %, após o tratamento do extrato bruto com os outros detergentes.

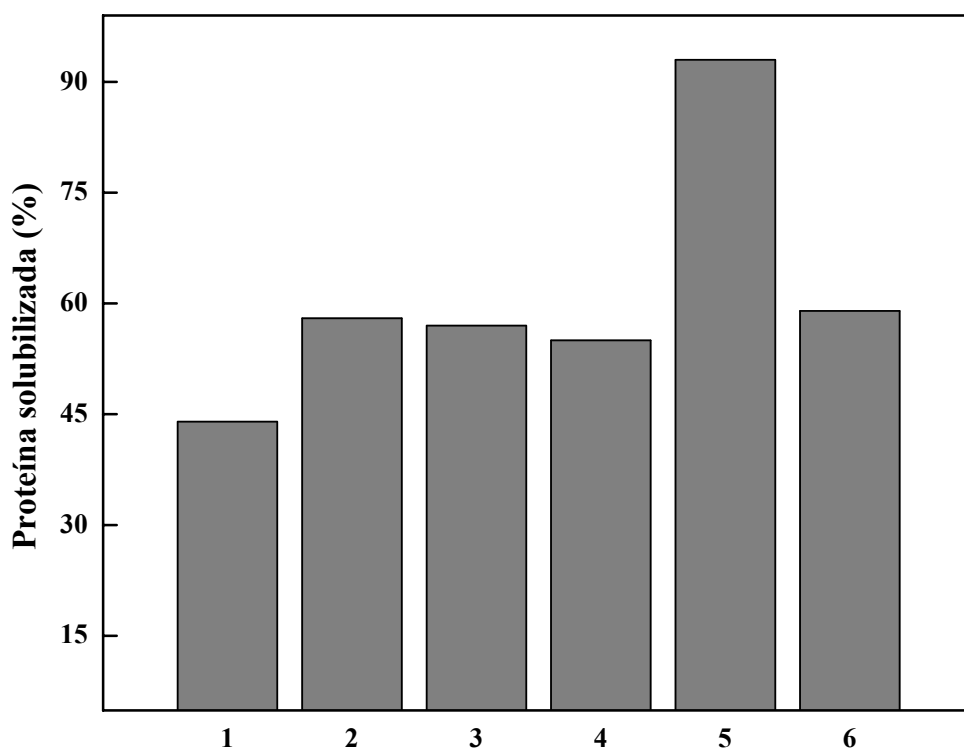


Figura 3 - Efeito de diferentes detergentes na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes detergentes: (1) controle, (2) CHAPS 0,4 %, (3) CHAPSO 0,3 %, (4) Tween 20 1 %, (5) SDS 0,1 % e (6) Polidocanol 5 %. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.

Para visualizar as proteínas após o tratamento do extrato bruto com os diferentes detergentes, foi realizada a eletroforese em condição desnaturante. Os resultados apresentados indicam que o sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % teve a maior recuperação de proteínas solúveis (**Figura 4A, canaleta 4a**). Consistente com esse achado, o *pellet* apresentou apenas algumas bandas protéicas discretas (**Figura 4A, canaleta 4b**). O perfil eletroforético do sobrenadante e *pellet* se mostrou similar quando a solubilização das proteínas de membrana dos parasitas foi realizada com os outros detergentes (**Figura 4A, canaletas 1, 2, 3 e 5, a e b**).

Como o SDS é um detergente altamente desnaturante, foi realizado um *Western Blotting* para verificar se o tratamento com esse detergente alteraria a atividade antigênica das proteínas. A **Figura 4B** mostra a análise do sobrenadante do extrato bruto sem tratamento e do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % com o soro contendo os anticorpos contra os determinantes imunogênicos de *L. amazonensis*. Como podemos observar, o material solubilizado não apresentou alteração significativa na ligação com o anticorpo (**Figura 4B, canaleta 2**).

4.2 - O efeito da concentração do detergente na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

O efeito da concentração do detergente na solubilização das proteínas de membrana dos parasitas foi estudado utilizando-se diferentes concentrações de SDS e Polidocanol e uma concentração fixa de 0,5 mg/mL do extrato bruto. Como já demonstrado, o SDS foi o detergente mais eficiente na solubilização das proteínas de membrana presentes no extrato bruto (**Figura 4A, canaleta 4a**). Porém, como ele é altamente desnaturante, concentrações maiores do Polidocanol também foram ensaiadas na tentativa de se conseguir uma maior

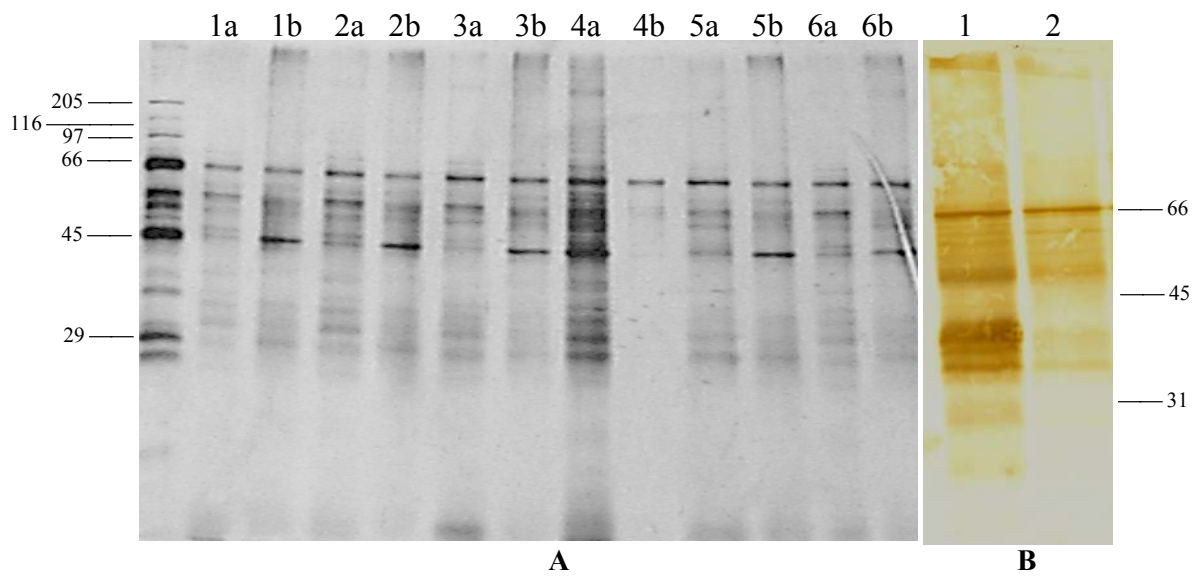


Figura 4 - (A) Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes detergentes: (1) CHAPS 0,4 %, (2) CHAPSO 0,3 %, (3) Tween 20 1 %, (4) SDS 0,1 %, (5) Polidocanol 5 % e (6) controle. O sobrenadante (a) e o *pellet* (b) separados após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora foram submetidos ao SDS-PAGE e coloração pela prata, conforme descrito nos itens 3.9 e 3.10 de Material e Métodos, respectivamente. **(B) Western Blotting.** Análise do sobrenadante do extrato bruto (1) e do sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1% (2) com o soro preparado como descrito no item 3.5 de Material e Métodos.

solubilização protéica das membranas com o uso desse detergente, sem precisar fazer o uso do SDS. Uma concentração de 5 % de Polidocanol foi responsável pela recuperação de 59 % de proteínas solúveis após centrifugação do extrato bruto a 100.000 x g por 1 hora (**Figura 3**). Como podemos observar na **Figura 5**, as concentrações de 7,5 e 10 % desse detergente não aumentaram a quantidade de proteínas solubilizadas após 2 horas de incubação.

Para se verificar o efeito da concentração do SDS na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas concentrações de 0,05 a 1 % do detergente. A **Figura 6** mostra a porcentagem de proteína solubilizada como uma função da concentração de SDS para uma quantidade fixa de proteína no extrato bruto. Sob essas condições, a porcentagem de proteína solúvel aumenta constantemente, alcançando o máximo de solubilização com 0,1 % de SDS. Concentrações maiores do detergente não melhoram o rendimento na solubilização do extrato bruto.

A **Figura 7** mostra o perfil eletroforético do extrato bruto, após o tratamento de 2 horas com as diferentes concentrações de SDS e Polidocanol. Como podemos observar, o Polidocanol não foi eficiente para solubilizar as proteínas de membrana presentes no extrato bruto (**Figura 7, canaletas 4b e 5b**). O perfil eletroforético do sobrenadante e *pellet* do extrato bruto tratado com o Polidocanol foi similar ao sobrenadante e *pellet* do extrato bruto sem nenhum tratamento (**Figura 7, canaletas 4, 5 e 6, a e b**). Por outro lado, os resultados apresentados indicam que o sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS teve a maior recuperação de proteínas solúveis (**Figura 7, canaletas 1a, 2a e 3a**). De acordo com a **Figura 7**, o rendimento das proteínas solúveis foi muito similar quando a solubilização das proteínas de membrana do parasita foi realizada com as diferentes concentrações de SDS. Porém, de acordo com a dosagem de proteínas, as concentrações de 0,1 % e 0,5 % se mostraram mais eficientes do que a concentração de 0,05 % (**Figura 6**).

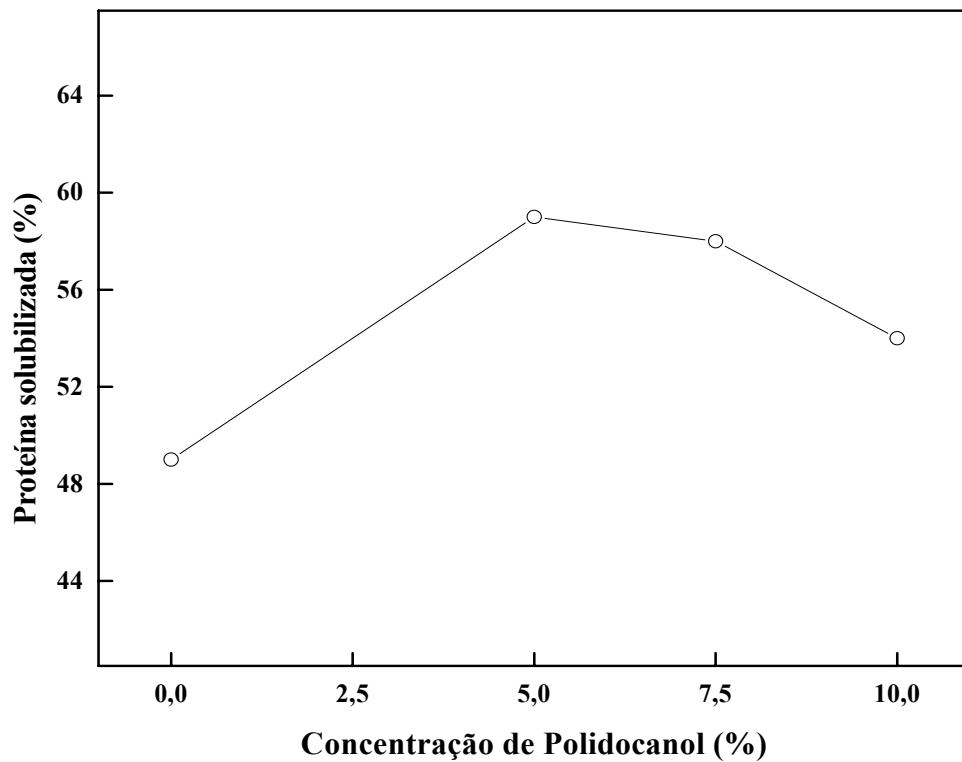


Figura 5 - Efeito da concentração do Polidocanol na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes concentrações de Polidocanol. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.

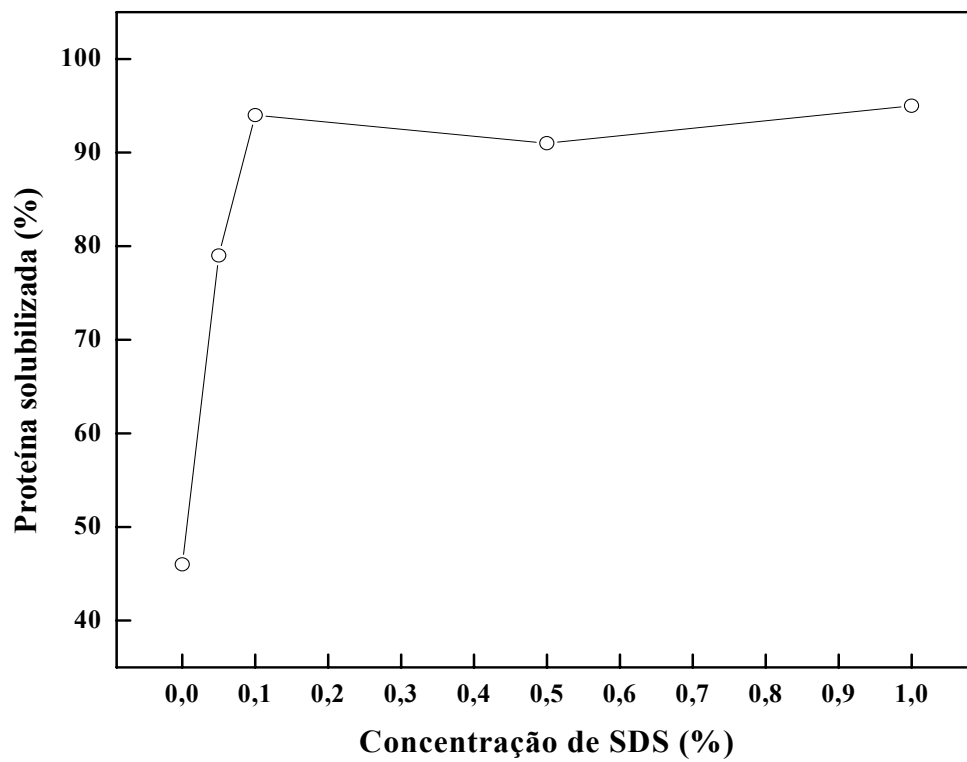


Figura 6 - Efeito da concentração do SDS na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes concentrações de SDS. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.

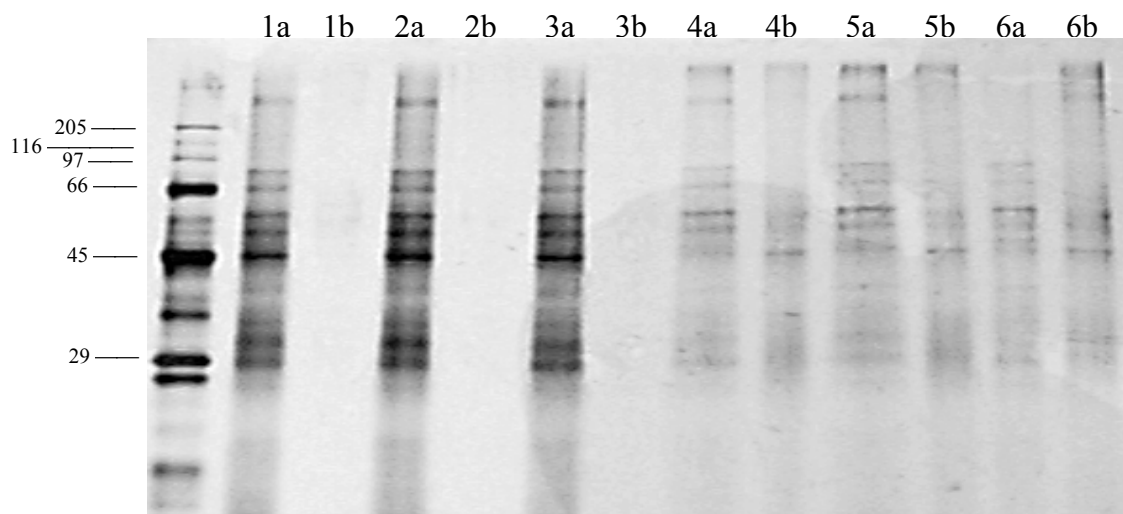


Figura 7 - Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com diferentes concentrações de SDS e polidocanol: (1) SDS 0,05 %, (2) SDS 0,1%, (3) SDS 0,5%, (4) Polidocanol 7,5%, (5) polidocanol 10% e (6) controle. O sobrenadante (a) e o *pellet* (b) separados após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora foram submetidos ao SDS-PAGE e coloração pela prata, conforme descrito nos itens 3.9 e 3.10 de Material e Métodos, respectivamente.

Assim, ficou constatado que o melhor detergente para solubilizar as proteínas de membrana do extrato bruto é o SDS na concentração de 0,1 %.

4.3 - O efeito da concentração da proteína na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

Uma vez selecionado o detergente mais eficiente e a sua concentração no processo de solubilização do extrato bruto, foi realizado um estudo para definir a concentração ideal de proteína no processo de solubilização. Nesse estudo, as concentrações de proteína do extrato bruto variavam de 0,2 a 0,75 mg/mL. O gráfico resultante, mostrado na **Figura 8**, revelou que o máximo de solubilização foi atingido quando 0,5 mg/mL do extrato bruto foi incubado com SDS 0,1 %, durante 2 horas. Nessas condições, a recuperação de proteínas solúveis do extrato bruto foi de 94 % após centrifugação a 100.000 x g por 1 hora.

4.4 - O efeito da temperatura e do tempo de incubação da proteína com o detergente na solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*

Finalmente, o efeito da temperatura e do tempo de incubação na solubilização das proteínas de membrana do extrato bruto foi estudado, fixando-se a concentração de SDS em 0,1 % e a concentração de proteína em 0,5 mg/mL. Nessas condições, o extrato bruto era incubado durante 0, 30, 60 e 120 minutos, tanto a temperatura ambiente como a 4°C. Os resultados apresentados na **Figura 9** indicam que a solubilização das proteínas de membrana do parasita ocorre instantaneamente e que tempos maiores de incubação não melhoram o rendimento de proteínas solúveis, que foi em torno de 96 % a temperatura ambiente e 94 % a 4°C.

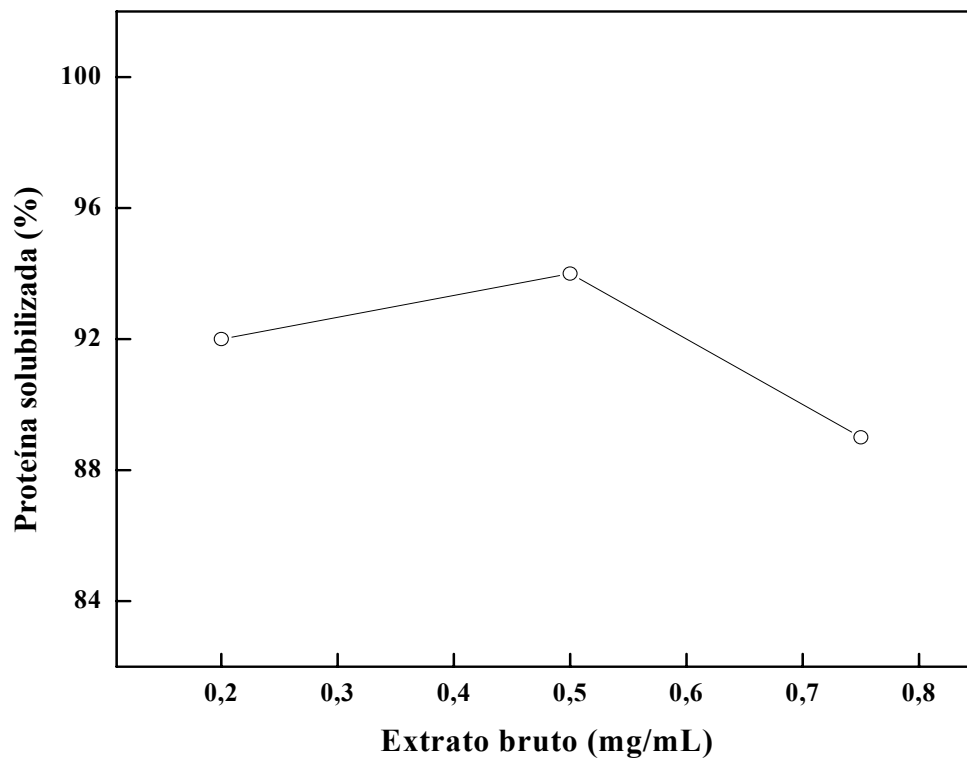


Figura 8 - Efeito da concentração da proteína na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*. Diferentes concentrações do extrato bruto foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com SDS 0,1%. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.

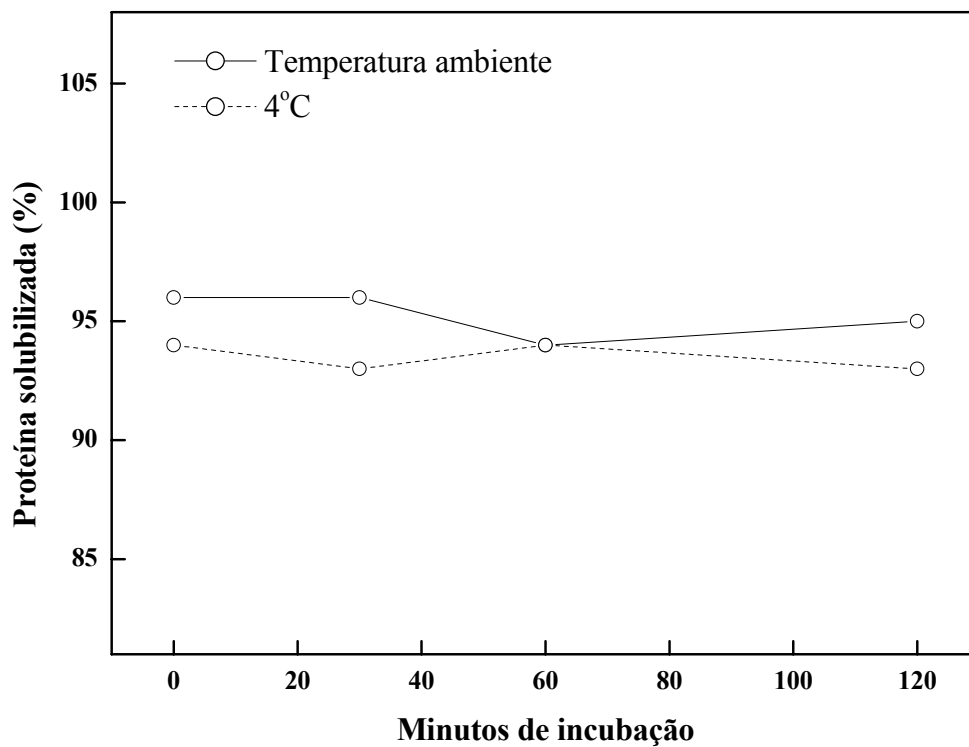


Figura 9 - Efeito da temperatura e do tempo de incubação na solubilização de proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis*. Aliquotas de 0,5 mg/mL do extrato bruto foram incubadas com SDS 0,1% durante 0, 30, 60 e 120 minutos, tanto a temperatura ambiente como a 4°C. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000 x g por 1 hora a 4°C. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no *pellet* e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.16 de Material e Métodos.

Assim, ficou definido que a solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* seria realizada com SDS 0,1 % e 0,5 mg/mL do extrato bruto, sem período de incubação. A recuperação das proteínas solúveis do extrato bruto seria realizada após a centrifugação desse material a 100.000 x g por 1 hora a 4°C.

Para facilitar a leitura, o sobrenadante do extrato bruto tratado com SDS 0,1 % recuperado como descrito no parágrafo anterior, será chamado desse ponto em diante de Extrato Bruto Solubilizado (EBS).

Uma vez determinadas as condições adequadas para a solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* foram realizados estudos sistemáticos para definir a melhor condição para a reconstituição do EBS em lipossomos.

4.5 - Preparação e caracterização dos proteolipossomos preparados com diferentes razões em massa de DPPC, DPPS e colesterol

A incorporação das proteínas solúveis do parasita em lipossomos foi realizada através do método de co-solubilização. Um passo importante para alcançar um alto rendimento na incorporação das proteínas nesses sistemas vesiculares é o estudo da composição lipídica mais adequada. Dessa forma, na preparação dos proteolipossomos foram utilizados DPPC, DPPS e colesterol com diferentes razões em massa. A **Tabela II** resume as características dos proteolipossomos preparados com as diferentes combinações lipídicas. A incorporação das proteínas presentes no EBS foi de 60 % nos lipossomos preparados com 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol. Quando os proteolipossomos foram preparados com 10 mg de DPPC ou 1 mg DPPC:1 mg DPPS:5 mg colesterol, a incorporação das proteínas foi em torno de 35 %. A incorporação mais baixa ocorreu nos proteolipossomos constituídos de 5 mg DPPC:5 mg DPPS.

Tabela II - Características dos proteolipossomos preparados com diferentes razões em massa de DPPC, DPPS e colesterol.

DPPC:DPPS:colesterol (Razão em massa)	Incorporação de proteína (%)	Número de Populações	Porcentagem de cada população	Diâmetro dos proteolipossomos (nm)
5:1:4	60	1	100,0	140,0
10:0:0	36	3	1,2	43,8
			45,9	326,9
			52,9	1.200,4
5:5:0	6	2	50,7	155,2
			49,3	525,8
1:1:5	34	2	6,7	62,8
			93,3	229,5

A proporção dos lipídeos utilizados também influenciou na homogeneidade desses sistemas vesiculares. DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:1:4 deram origem a uma única população de proteolipossomos com um diâmetro médio de 140 nm. O maior número de populações foi observado quando os proteolipossomos foram preparados com 10 mg de DPPC. Nessas condições, foram encontrados três populações com diâmetros variando entre 43,8 e 1.200,4 nm. Os sistemas vesiculares preparados com DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:5:0 ou 1:1:5 deram origem a duas populações distintas (**Tabela II**). A **Figura 10** mostra as populações dos proteolipossomos preparados com as quatro combinações distintas.

Para detectar as proteínas presentes nos proteolipossomos preparados com as diferentes combinações lipídicas foi realizada a eletroforese em condição desnaturante. Uma banda protéica com massa molecular em torno de 60 kDa foi preferencialmente incorporada nos proteolipossomos preparados com 1 mg DPPC:1 mg DPPS:5 mg colesterol (**Figura 11, canaleta 5**). Por outro lado, não houve seletividade na incorporação das proteínas quando os proteolipossomos foram preparados com as outras três combinações lipídicas. Como podemos observar, o perfil eletroforético desses proteolipossomos e do EBS foi similar (**Figura 11, canaletas 1, 2, 3 e 4**).

A partir desses resultados, padronizamos uma metodologia de obtenção de proteolipossomos utilizando-se 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol. Essa relação foi escolhida porque proporcionou a maior porcentagem de incorporação das proteínas presentes no EBS, além de dar origem a uma população homogênea de proteolipossomos. Uma outra vantagem dessa formulação foi a sua capacidade de incorporar praticamente todas as proteínas da solução, sem uma seletividade marcante. Além disso, esses proteolipossomos também se mostraram muito estáveis, apresentando uma única população com diâmetro de 150 nm, mesmo após quinze dias de preparo.

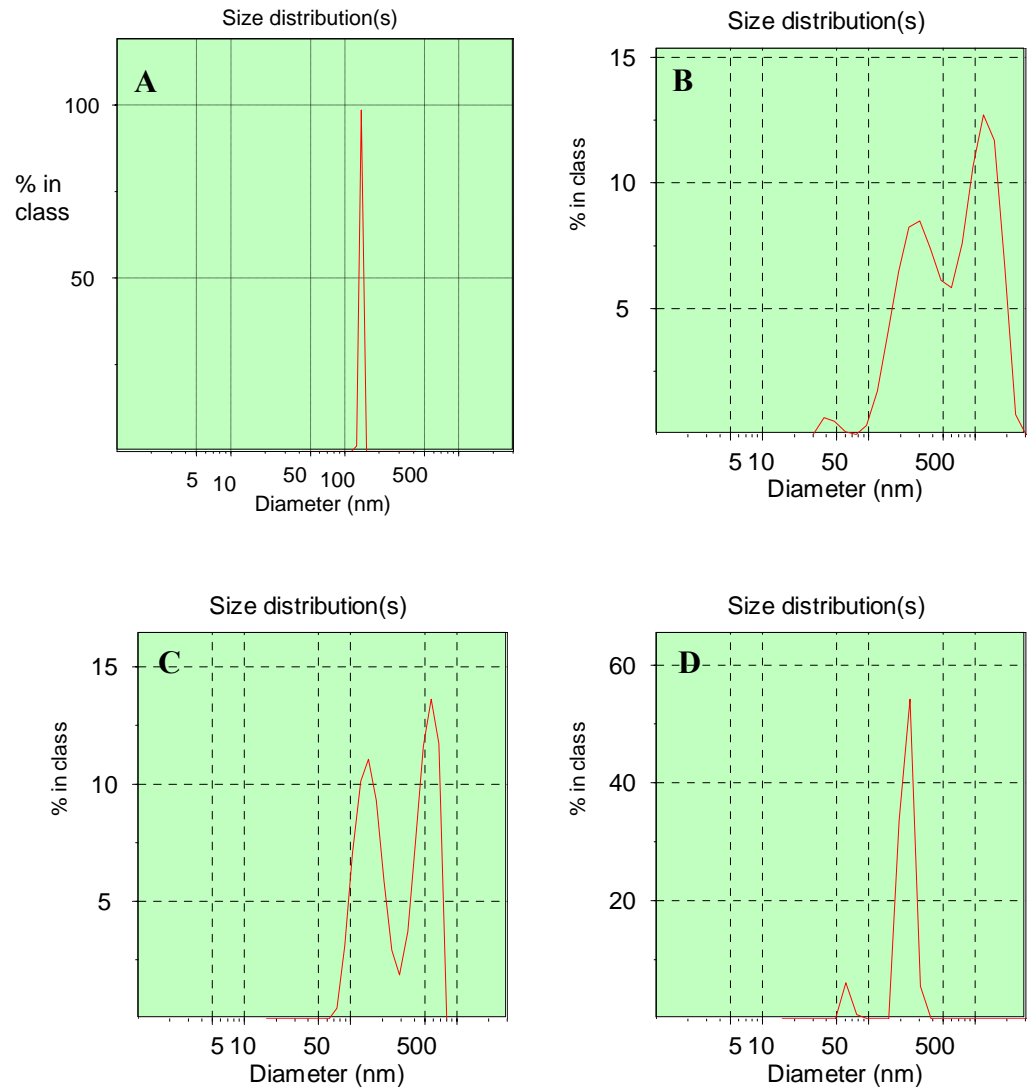


Figura 10 - Análise da distribuição por tamanho dos proteolipossomos preparados com as diferentes combinações lipídicas. Os proteolipossomos preparados, conforme descrito no item 3.12 de Material e Métodos, utilizando-se DPPC, DPPS e colesterol nas seguintes razões em massa: (A) 5:1:4, (B) 10:0:0, (C) 5:5:0 ou (D) 1:1:5 foram submetidos ao ensaio de espalhamento de luz.

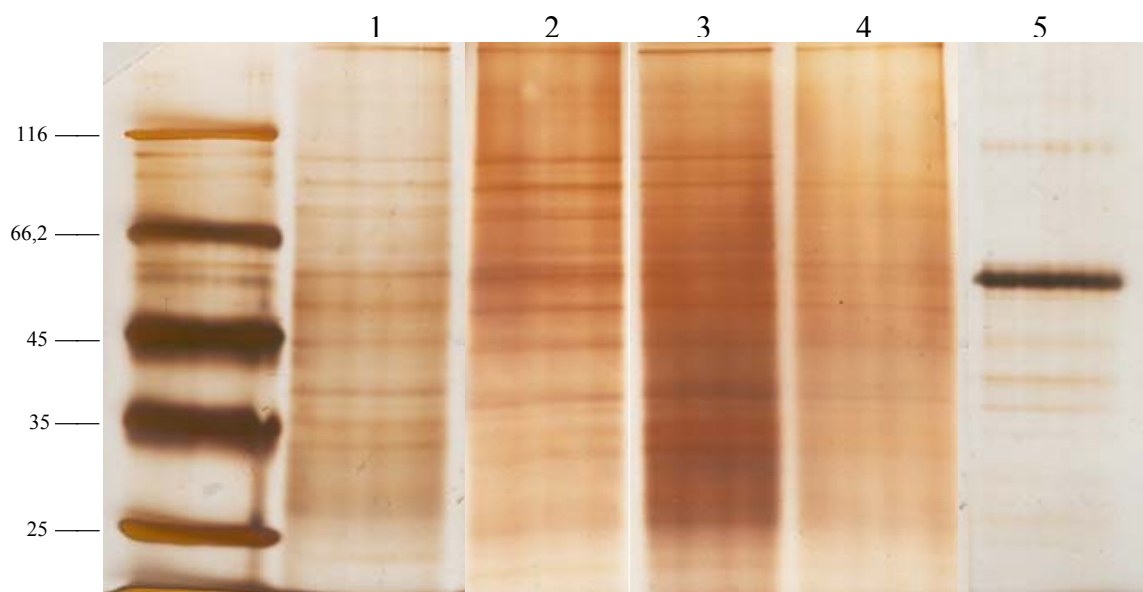


Figura 11 - Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata. (1) EBS e proteolipossomos utilizando-se DPPC, DPPS e colesterol nas seguintes razões em massa: (2) 5:1:4, (3) 10:0:0, (4) 5:5:0 ou (5) 1:1:5.

4.6 - Caracterização dos proteolipossomos preparados com 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol

Os proteolipossomos preparados com 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol foram submetidos a uma centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. Este estudo foi feito para caracterizar o grau de incorporação nos lipossomos das proteínas presentes no EBS. Como podemos observar na **Figura 12A**, o EBS revelou a presença de proteínas no meio do gradiente, na faixa de 14,2 a 16,2 % de sacarose. Com os lipossomos, um pico correspondente ao conteúdo de fosfato inorgânico foi observado ao redor de 12 % de sacarose. Finalmente, os proteolipossomos mostraram um único pico em concentrações de sacarose ao redor de 11,3 %. Esse pico único, correspondente ao conteúdo de fosfato inorgânico e proteína, indica uma eficiente incorporação durante a reconstituição das proteínas presentes no EBS nos sistemas de lipossomos.

Os proteolipossomos preparados com 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol e 0,5 mg EBS foram submetidos a uma TLC para verificar se esses sistemas continuavam mantendo a mesma razão em massa, após a incorporação das proteínas. Os lipossomos também foram submetidos à cromatografia e a análise está mostrada na **Figura 13**. As manchas correspondem aos lipídeos detectados com vapores de iodo. Após a marcação e descoloração total dessas manchas, a sílica foi raspada e o lipídeo foi extraído para a quantificação de fosfolipídeo e colesterol.

A **Tabela III** fornece a razão em massa e em molaridade dos lipossomos e proteolipossomos antes e depois da preparação. Na preparação dos lipossomos e proteolipossomos foram utilizados 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol, o que significa que a mistura inicial tinha uma razão em massa de 5:1:4. Nos lipossomos prontos, essa razão em massa passou para 3:1:3.

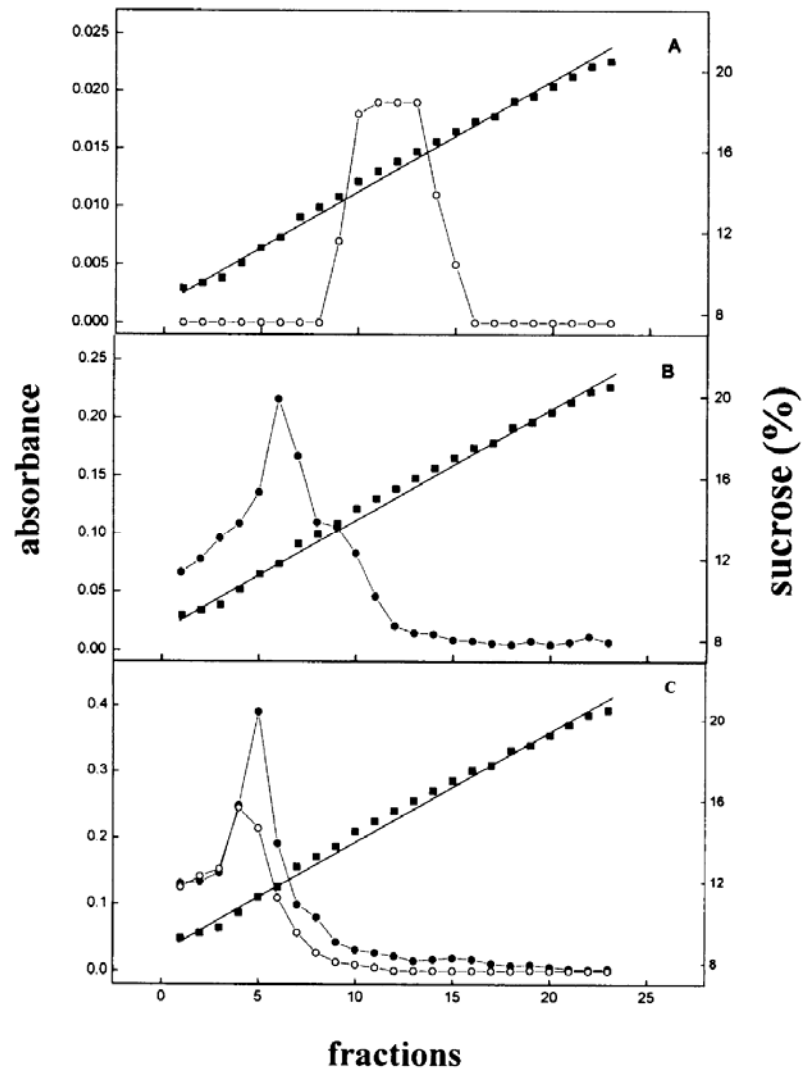


Figura 12 - Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. (A) EBS, (B) lipossomos e (C) proteolipossomos. Análise espectrofotométrica: (○) proteína, utilizando-se comprimento de onda de 820 nm e (●) lipídeo, utilizando-se comprimento de onda de 595 nm. (■) porcentagem de sacarose determinada por refratometria.

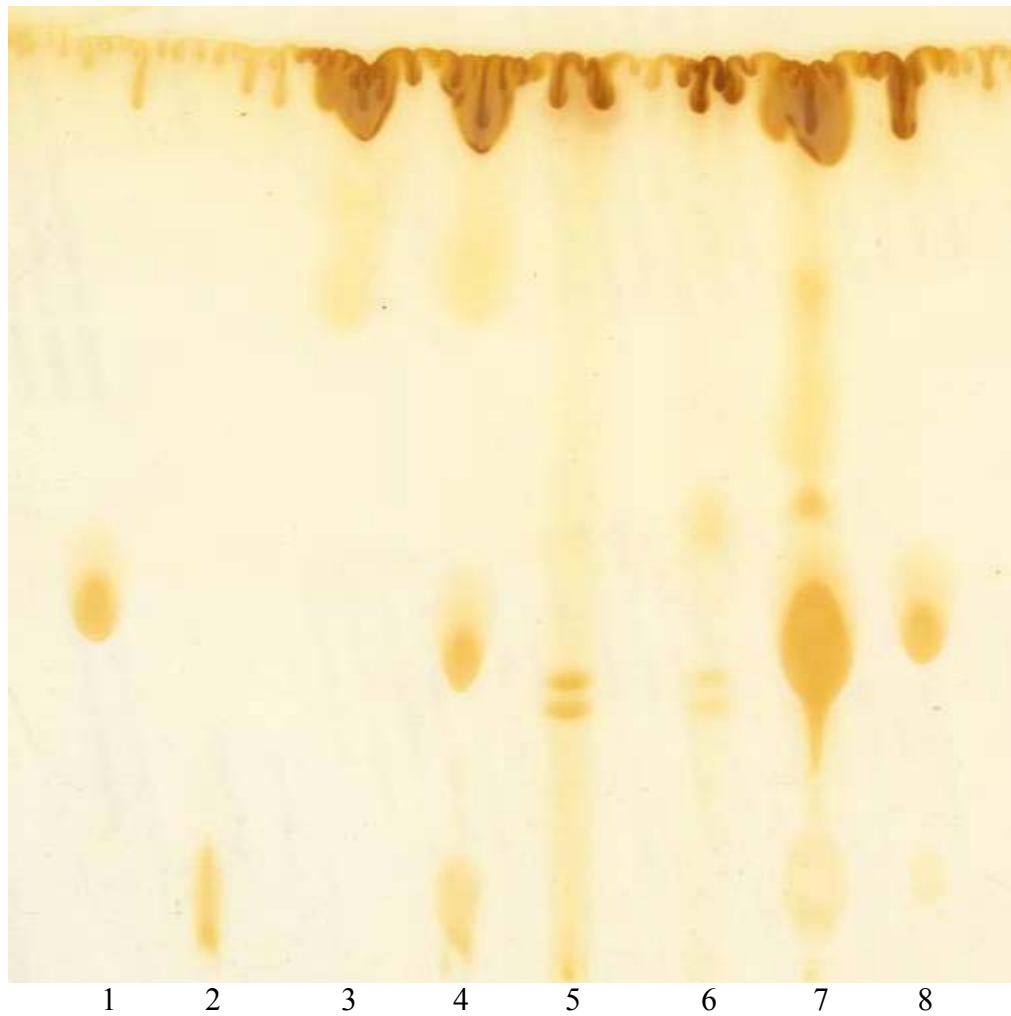


Figura 13 - TLC. A placa de sílica foi submetida a dois solventes, na mesma direção. O solvente primário era composto por clorofórmio:metanol:amônia (65:35:5 v/v) e o secundário por clorofórmio:metanol:acetona:ácido acético:água (10:2:4:2:1 v/v). Após a cromatografia, os lipídios foram detectados com vapores de iodo. As frações correspondem a: (1) DPPC, (2) DPPS, (3) colesterol, (4) DPPC, DPPS e colesterol, (5) extrato bruto, (6) EBS, (7) proteolipossomos e (8) lipossomos.

Tabela III - Composição lipídica dos lipossomos e dos proteolipossomos determinada por TLC.

Amostra	DPPC:DPPS:Coolesterol	DPPC:DPPS:Coolesterol
	(a)	(b)
Mistura inicial	5:1:4	5:1:7
Lipossomos	3:1:3	3:1:6
Proteolipossomos	1:1:5	1:1:9

a: razão em massa

b: razão em molaridade

Durante a formação dos proteolipossomos, a razão em massa de DPPC, DPPS e colesterol passou de 5:1:4 para 1:1:5 (**Tabela III**). A análise desse valor indica que houve uma perda de DPPC e um aumento na concentração de colesterol. Provavelmente, esse processo ocorreu para incorporar e estabilizar as proteínas de *L. amazonensis* no sistema vesicular. Além disso, a diminuição de DPPC durante a formação dos proteolipossomos pode ter ocorrido devido à formação de lipossomos livres de proteínas e também devido à adsorção desse fosfolípídeo com a resina Calbiosorb[®].

Para verificar o potencial desses sistemas vesiculares em induzir a produção de anticorpos contra as proteínas de *L. amazonensis*, cinco camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados pela via i.p. com 20 µg de proteolipossomos preparados com DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:1:4. A **Figura 14B** mostra o *Western Blotting* do EBS previamente separado por eletroforese, transferido para uma membrana de nitrocelulose e imunocorado com o anticorpo secundário acoplado à peroxidase. Como podemos observar, as bandas protéicas foram reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados com proteolipossomos, indicando que esses sistemas vesiculares apresentam atividade imunogênica (**Figura 14B, canaleta 2**). Assim como as amastigotas de *L. amazonensis* (**Figura 14B, canaleta 1**), os proteolipossomos também induzem uma resposta imune humoral após a inoculação em camundongos BALB/c. A **Figura 14A** mostra novamente o perfil eletroforético do EBS antes (**canaleta 1**) e depois da incorporação nos sistemas de lipossomos (**canaleta 2**). Essa figura enfatiza a incorporação não seletiva das proteínas de *L. amazonensis* nesses sistemas.

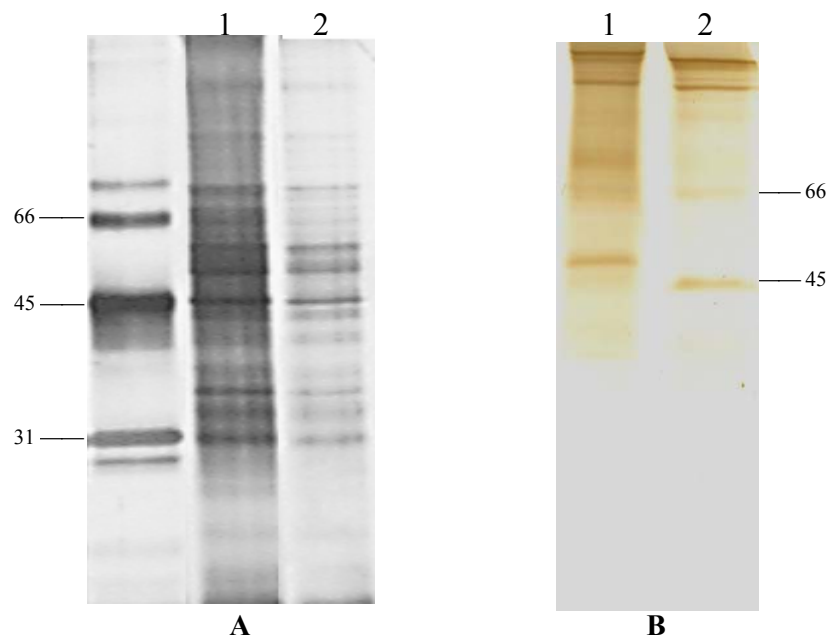


Figura 14 - (A) Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e coloração pela prata. (1) EBS e (2) proteolipossomos. (B) *Western Blotting*. Análise do EBS com o soro preparado como descrito no item 3.5 de Material e Métodos (1) e com soro coletado 3 semanas após imunização i.p. de camundongos BALB/c com 20 μ g de proteolipossomos (2).

4.7 - Avaliação da proteção contra a infecção com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c após duas imunizações com os proteolipossomos por via i.p. ou s.c.

Após a caracterização dos proteolipossomos constituídos de 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol, testamos a atividade protetora dessa preparação. Para isso, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com tampão Tris-HCl (5 mM, pH 7,5), lipossomos, 20 µg do EBS ou 20 µg de proteolipossomos. Os camundongos receberam duas imunizações com intervalo de três semanas e duas semanas após a última imunização foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Para se testar a melhor via de imunização, os animais receberam as preparações tanto pela via s.c. como pela via i.p.

Como podemos observar na **Figura 15**, os camundongos que receberam 20 µg do EBS ou lipossomos não foram protegidos da doença e tiveram as lesões características da leishmaniose cutânea experimental. Esse resultado se aplica para as duas vias de imunização testadas. Até a quarta semana de infecção, os animais imunizados com os proteolipossomos tiveram um padrão de crescimento no tamanho da lesão semelhante aos animais que receberam tampão e esse fato pode ser observado nas duas vias de imunização utilizadas (**Figura 16**). Na quinta semana após a infecção, o grupo imunizado com os proteolipossomos pela via i.p. apresentou uma lesão 59 % menor quando comparado com o grupo que recebeu tampão. Esse valor caiu para 45 % quando os animais estavam com 6 semanas de infecção e na décima semana, a proteção do grupo foi de apenas 14 %. Por outro lado, os animais imunizados com os proteolipossomos pela via s.c. apresentaram uma exacerbação da doença. Na oitava e nona semana após a infecção, a média do tamanho da lesão desse grupo foi 40 % maior quando comparada ao grupo controle e esse valor caiu para 33 % no final do experimento (**Figura 16**).

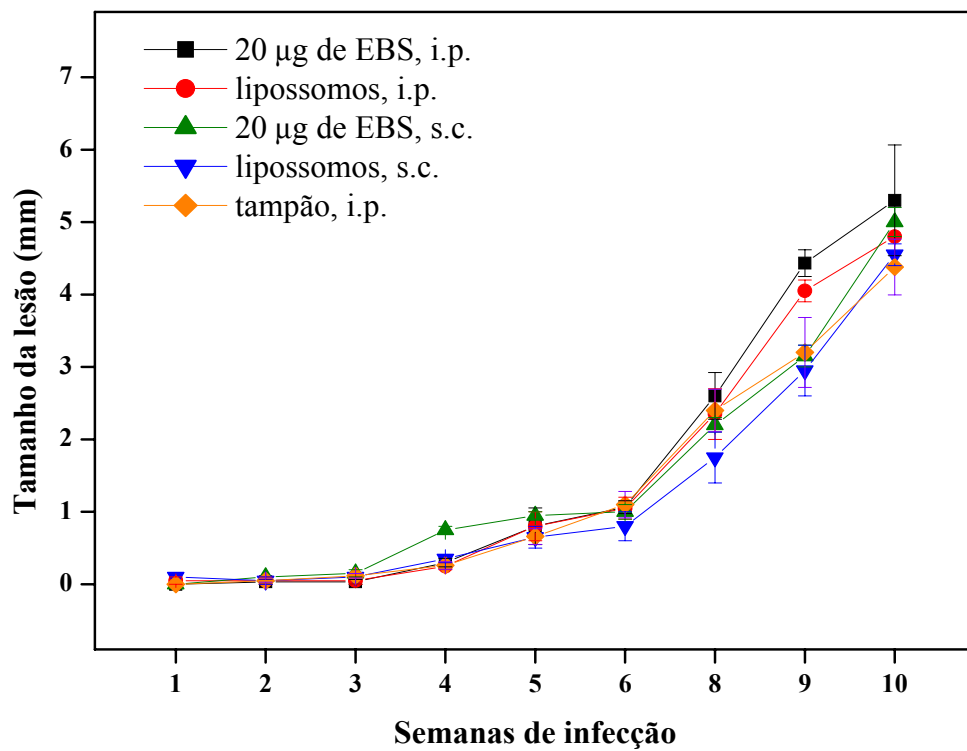


Figura 15 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. ou s.c. com EBS, lipossomos ou tampão e desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam duas imunizações com intervalo de três semanas. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

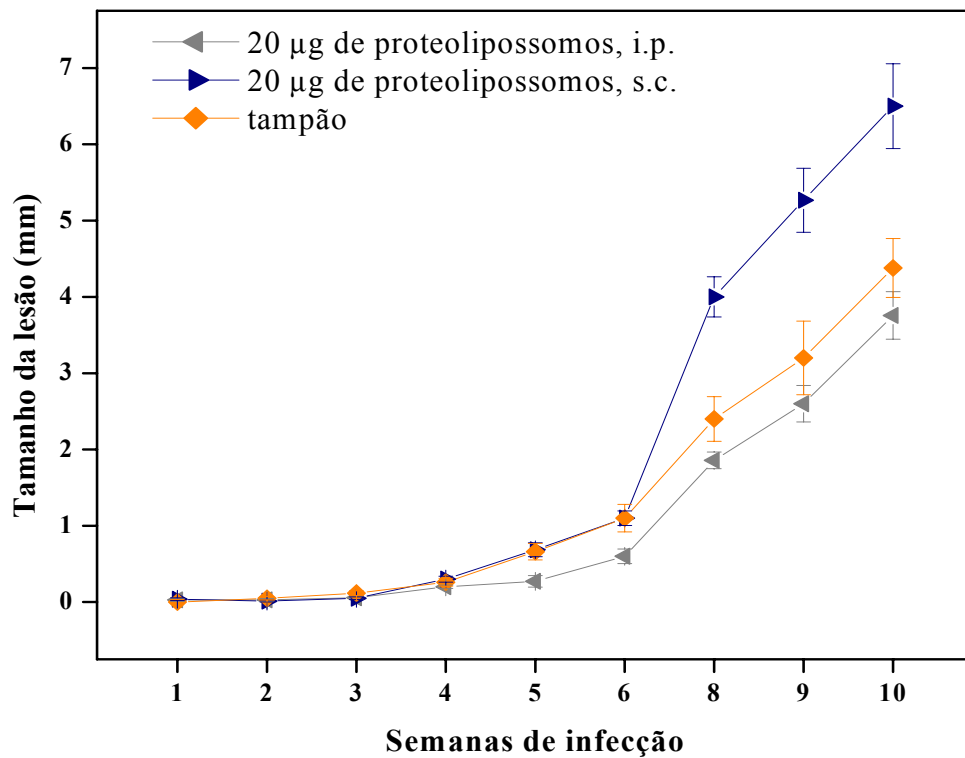


Figura 16 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. ou s.c. com proteolipossomos ou tampão e desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam duas imunizações com intervalos de três semanas. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

Os resultados apresentados na **Figura 16** sugerem que a imunização dos proteolipossomos pela via i.p. confere uma proteção apenas no início da doença e essa proteção vai decaindo durante as semanas de infecção até se tornar insignificante no final do experimento. Por outro lado, os animais que receberam esses sistemas vesiculares pela via s.c. tiveram lesões maiores do que os camundongos que receberam tampão.

4.8 - Avaliação da proteção contra a infecção com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6 após uma imunização com os proteolipossomos por via i.p.

Na tentativa de buscar uma melhor proteção com os proteolipossomos inoculados pela via i.p., decidimos variar alguns parâmetros, como a concentração dos proteolipossomos, a quantidade de imunizações e o intervalo entre a imunização e o desafio. Nesse estudo, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram imunizados uma única vez com 10, 20 ou 40 µg de proteolipossomos e após três semanas foram desafiados com 10⁶ promastigotas de *L. amazonensis*, na pata traseira direita.

O curso da infecção dos camundongos BALB/c está representado na **Figura 17A** e a **Figura 17B** mostra a evolução da infecção dos camundongos C57BL/6. Como podemos observar, uma proteção dose dependente foi observada durante o curso de infecção dos camundongos BALB/c previamente imunizados com os proteolipossomos (**Figura 17A**). A **Figura 18** mostra de forma mais clara o nível de proteção desses animais para cada concentração de proteolipossomo utilizada na imunização. Na sexta semana de infecção, o grupo de animais que recebeu 40 µg da vacina teve um nível de proteção de 69 % quando comparado ao grupo que recebeu tampão. Na oitava semana, esse valor caiu para 51 % mantendo-se constante até o final do experimento. O grupo que recebeu 10 µg de proteolipossomos chegou ao final do experimento com uma proteção de 25 % e esse valor foi 1,4 vezes maior no grupo que recebeu 20 µg dos sistemas vesiculares. Por outro lado, os

camundongos da linhagem C57BL/6 não apresentaram uma proteção dose dependente após a imunização com as diferentes concentrações de proteolipossomos. Os grupos experimentais que receberam 10 ou 20 µg da vacina não apresentaram nenhum nível de proteção durante as doze semanas de infecção (**Figura 17B**). Por outro lado, a proteção conferida pela concentração de 40 µg de proteolipossomos começou a ficar evidente a partir da quarta semana de infecção. Nesta etapa do experimento, os animais desse grupo não apresentavam nenhuma lesão. Essa proteção foi diminuindo durante todo o curso da infecção, chegando a 65 % na sétima semana de infecção e 46 % no final do experimento (**Figura 17B**).

Vale lembrar que o curso da infecção por *L. amazonensis* ocorre de maneira diferente entre as duas linhagens de camundongos utilizadas neste trabalho. Os camundongos da linhagem BALB/c são muito mais suscetíveis a esse parasita do que os camundongos C57BL/6. Esse fato pode ser facilmente visualizado na **Figura 19** após a comparação do tamanho da lesão das duas linhagens previamente inoculadas com o tampão. Da quinta até a sétima semana de infecção, as lesões observadas nos camundongos da linhagem BALB/c tinham o dobro do tamanho daquelas observadas na outra linhagem. Na décima semana, o tamanho da lesão dos camundongos BALB/c era seis vezes maior e esse valor passou para oito vezes no final do experimento (**Figura 19**). Curiosamente, os camundongos da linhagem BALB/c vacinados com 40 µg de proteolipossomos tiveram um padrão de crescimento no tamanho da lesão semelhante aos animais da linhagem C57BL/6 que receberam tampão. Esse fato pode ser observado até a sétima semana de infecção (**Figura 19**).

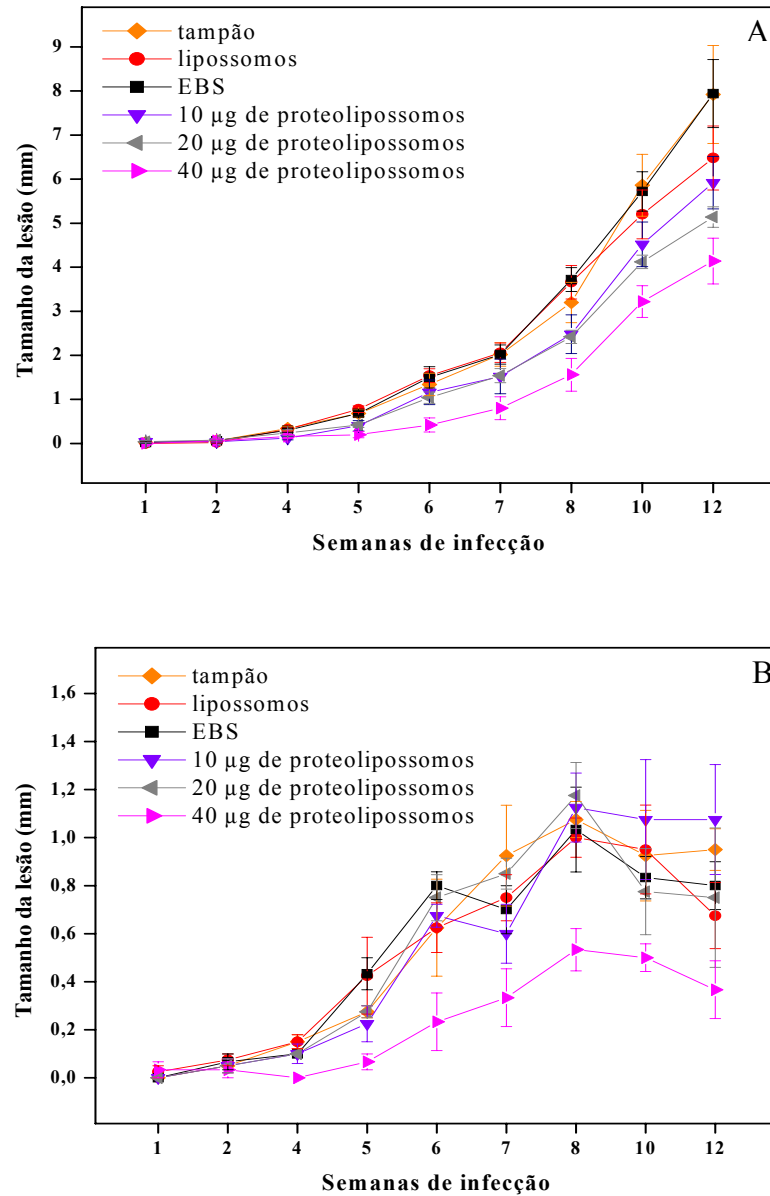


Figura 17 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados por via i.p. com tampão, lipossomos, EBS ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos. Curso da infecção de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B).

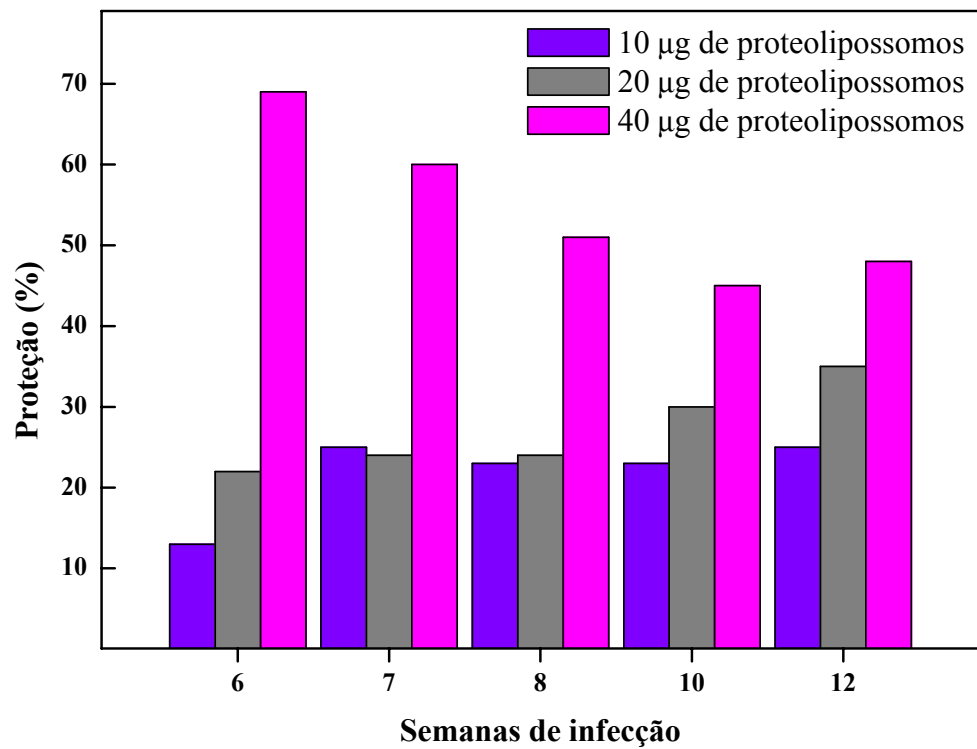


Figura 18 - Nível de proteção de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

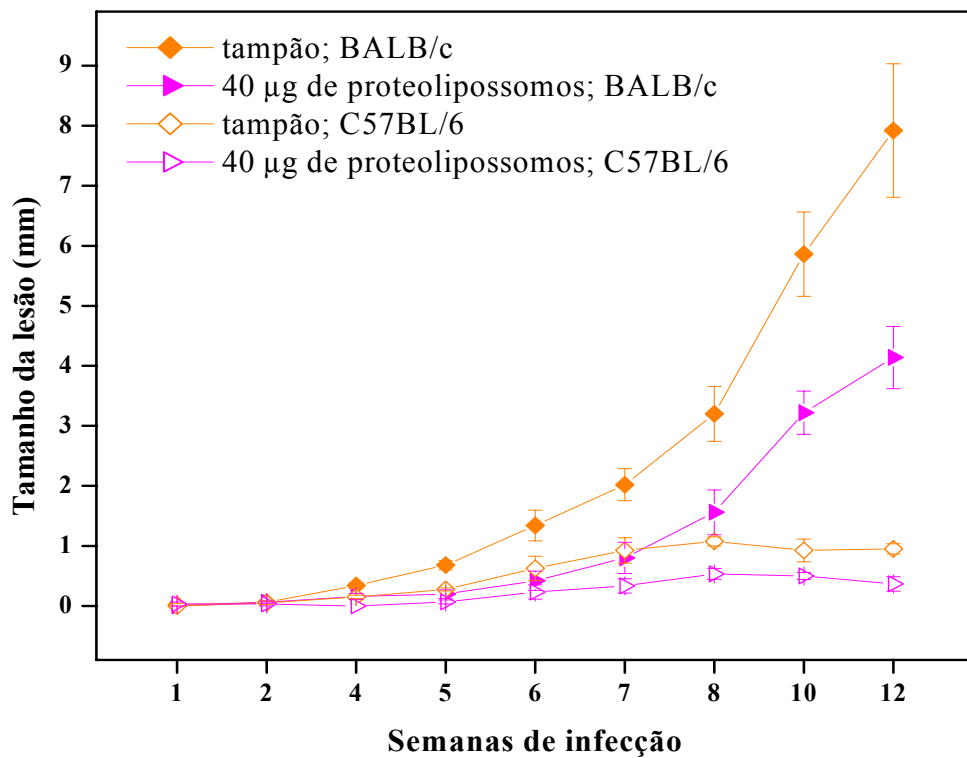


Figura 19 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados por via i.p. com tampão ou 40 µg de proteolipossomos e desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

4.9 - Avaliação da proteção contra a infecção com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c após uma imunização com os proteolipossomos por via i.p.

Como descrito anteriormente, uma proteção dose dependente foi observada durante o curso de infecção dos camundongos BALB/c previamente imunizados com os proteolipossomos. Os animais foram vacinados com 10, 20 ou 40 µg de proteolipossomos e a melhor proteção foi observada após o inóculo i.p. da maior concentração da vacina (**Figura 18**). Esses resultados nos levaram a pensar que concentrações maiores que 40 µg poderiam ser mais eficientes na proteção contra a leishmaniose cutânea experimental. Dessa forma, passamos a investigar o curso dessa doença em camundongos previamente imunizados com 40, 80 ou 120 µg de proteolipossomos. Além da concentração da vacina, outro parâmetro variado nesse estudo foi a quantidade de promastigotas de *L. amazonensis* utilizada no desafio. Três semanas após a vacinação, os camundongos BALB/c foram desafiados com 10^5 ou 10^4 parasitas.

O curso da infecção dos camundongos desafiados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* está representado na **Figura 20** e a **Figura 21** mostra a evolução da infecção dos camundongos infectados com 10^4 parasitas. Os camundongos que foram vacinados com 40 µg de proteolipossomos e desafiados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* tiveram uma proteção de 53 %, quando comparados aos animais que receberam tampão (**Figura 20**). Essa proteção, observada na oitava semana de infecção, praticamente se manteve constante até a décima segunda semana e passou para 33 % no final do experimento. Os outros dois grupos experimentais imunizados com os proteolipossomos apresentaram basicamente o mesmo padrão de proteção frente à infecção por *L. amazonensis*. Da décima até a décima segunda semana de infecção esses dois grupos tiveram um nível de proteção em torno de 87 % e no final do experimento esse valor passou para 61 %.

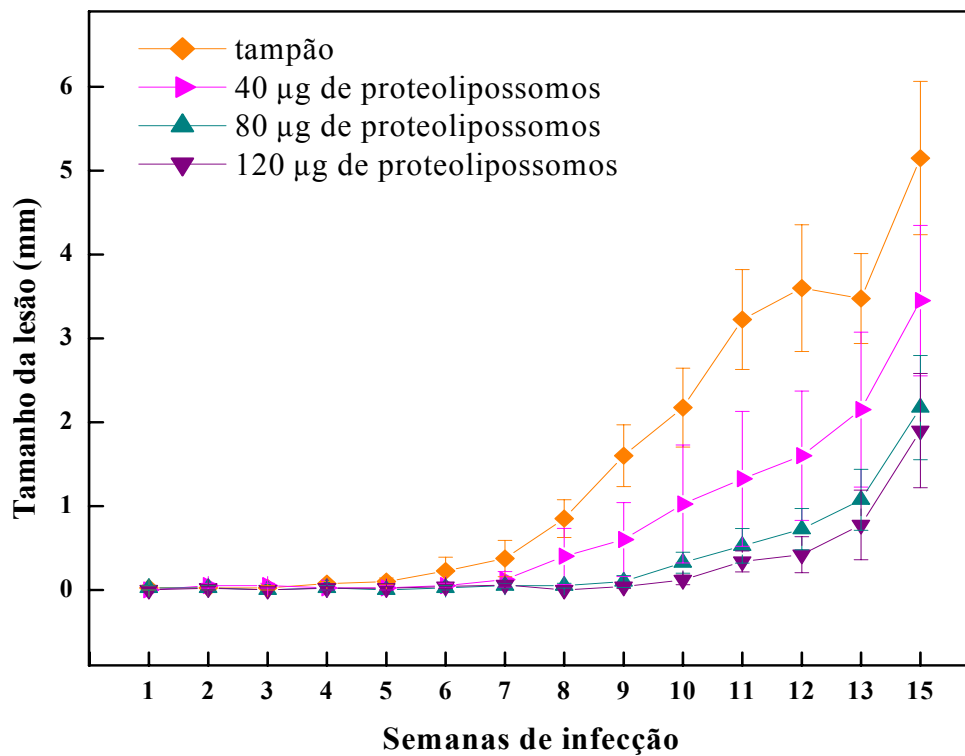


Figura 20 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

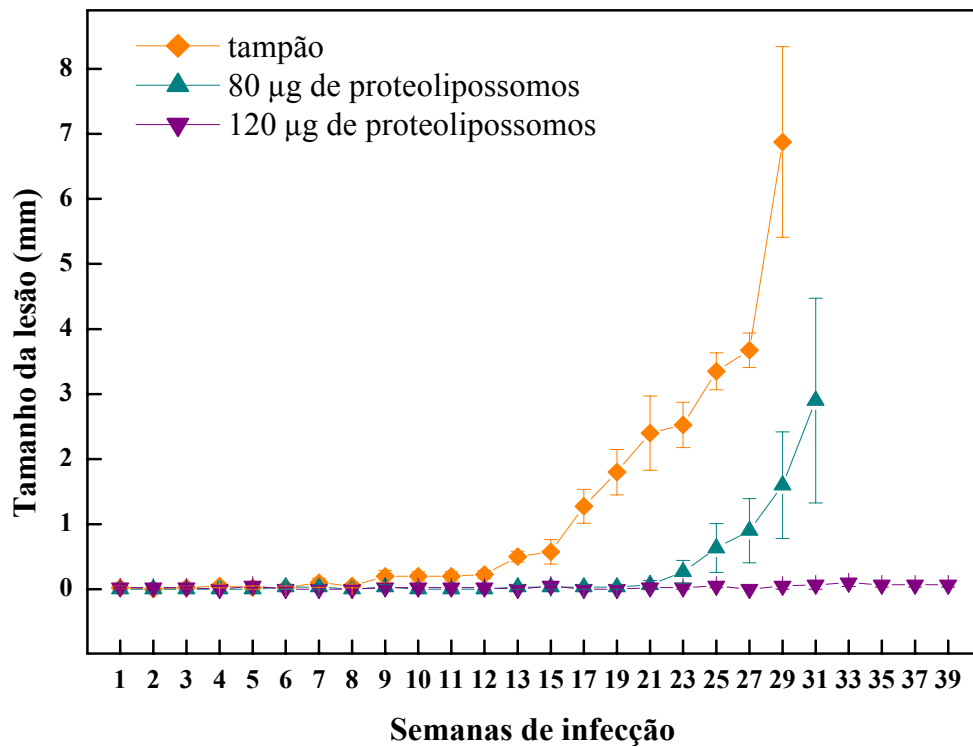


Figura 21 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão ou diferentes concentrações de proteolipossomos e desafiados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

Até a vigésima primeira semana uma proteção de 100 % pode ser observada nos animais imunizados com 80 µg da vacina de infecção e desafiados com 10^4 parasitas (**Figura 21**). Com vinte e cinco semanas, esse valor caiu para 81 % e, quando esses animais estavam na vigésima nona semana de infecção, a proteção foi de 77 %. Os animais imunizados com 120 µg de proteolipossomos não desenvolveram nenhuma lesão durante os nove meses de experimento, o que indica uma proteção de 100 %. A **Figura 22** mostra a lesão dos animais inoculados com tampão, 80 e 120 µg de proteolipossomos. Esses animais foram fotografados quando estavam com vinte e nove semanas de infecção. Como podemos observar, os animais imunizados com a maior concentração da vacina não apresentaram qualquer sinal de lesão e a pata infectada tem o mesmo tamanho da contralateral.

4.10 - Avaliação *in vivo* do papel de IFN- γ e IL-12 na proteção de camundongos C57BL/6 após a imunização com os proteolipossomos por via i.p.

Para avaliar a importância *in vivo* do IFN- γ e IL-12 na proteção induzida pela imunização com os proteolipossomos, camundongos C57BL/6 (WT, IFN- γ KO ou IL-12 KO) foram imunizados por via i.p. com tampão ou 40 µg de proteolipossomos e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita com 10^6 parasitas (**Figura 23**). Quando comparados aos animais WT que receberam tampão, os camundongos WT que receberam a vacina apresentavam uma proteção de 44, 52 e 54 %, na quarta, sexta e sétima semana de infecção, respectivamente. Os animais IL-12 KO vacinados com os proteolipossomos não foram protegidos contra a doença e desenvolveram lesões semelhantes aos animais IL-12 KO que receberam tampão. A partir da sexta semana, os camundongos IL-12 KO, vacinados ou não, desenvolveram lesões com o dobro do tamanho daquelas observadas nos animais WT não vacinados.

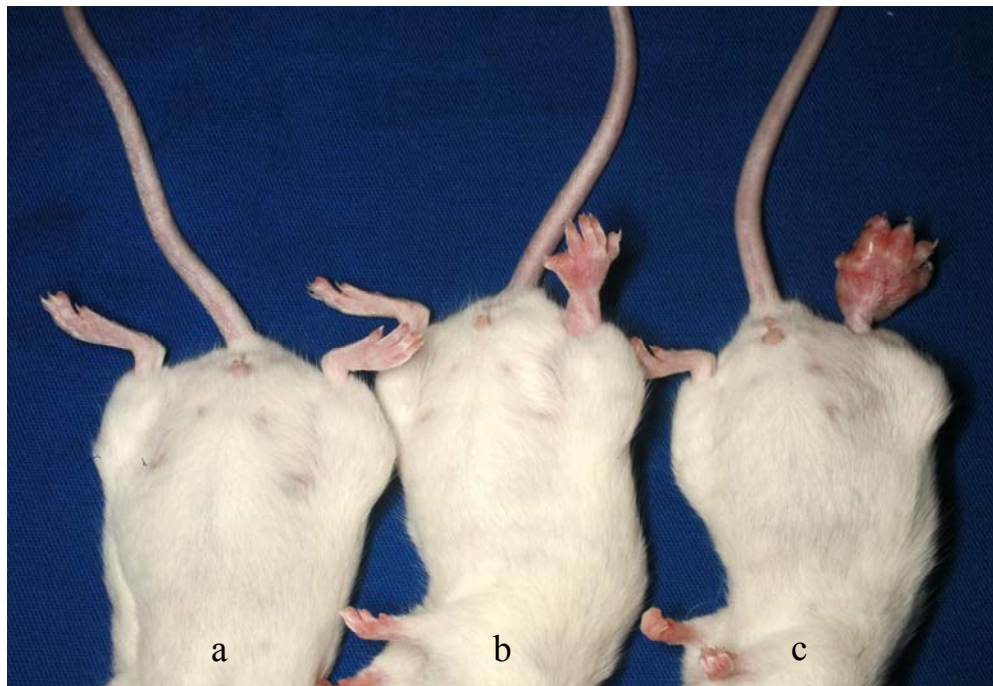


Figura 22 - Tamanho da lesão de camundongos BALB/c imunizados por via i.p. com tampão, 80 ou 120 μ g de proteolipossomos e desafiados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis*. Os camundongos receberam uma imunização e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita. As imagens foram feitas quando os animais estavam com vinte e nove semanas de infecção após a imunização com 120 (a) ou 80 μ g de proteolipossomos (b) ou tampão (c).

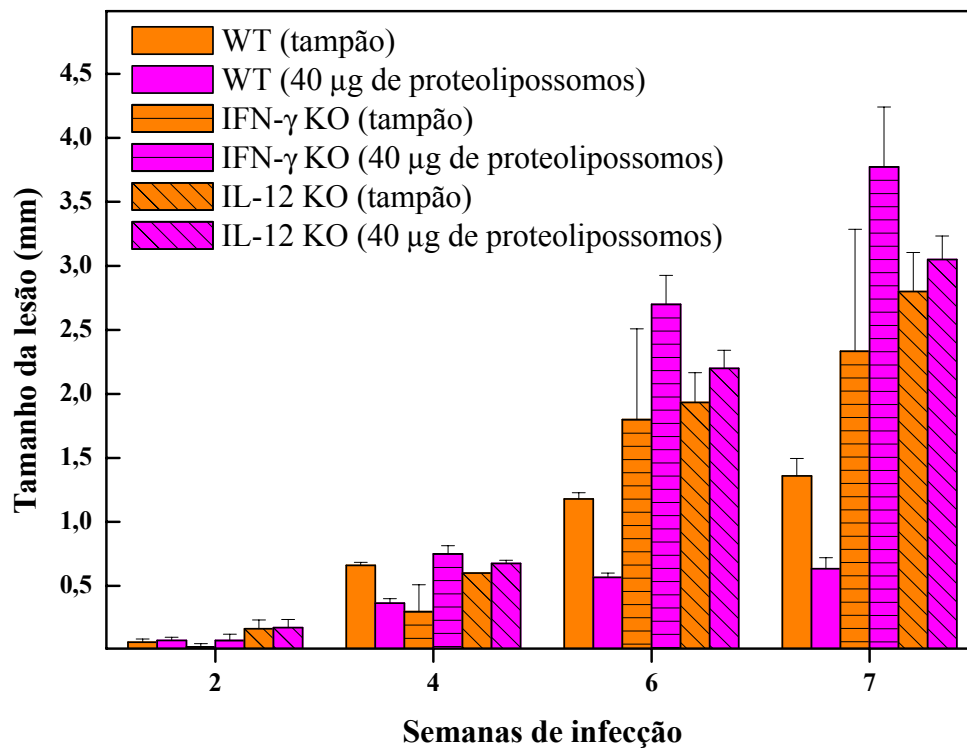


Figura 23 - O papel *in vivo* de IFN- γ e IL-12 na proteção de camundongos C57BL/6 induzida pelos proteolipossomos. Os camundongos (WT, IFN- γ KO ou IL-12 KO) foram imunizados por via i.p. com tampão ou 40 μ g de proteolipossomos e após três semanas foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita com 10^6 parasitas. A medida e o cálculo do tamanho da lesão das patas foram feitos como descrito no item 3.19 de Material e Métodos.

Assim como os camundongos IL-12 KO, os animais INF- γ KO também não foram protegidos contra a leishmaniose cutânea experimental após a imunização com os proteolipossomos (**Figura 23**). Esses animais, vacinados ou não, também desenvolveram lesões maiores do que aquelas observadas nos animais WT não vacinados. Curiosamente, os camundongos INF- γ KO vacinados desenvolveram lesões maiores do que os não vacinados.

5 - DISCUSSÃO

No modelo de mosaico fluido, a membrana plasmática de uma célula é formada basicamente por lipídeos e proteínas. Os lipídeos constituem o substrato estrutural, enquanto as proteínas são responsáveis pelas atividades biológicas que acontecem na superfície da membrana plasmática. Para que um organismo estranho (vírus, bactéria ou parasita) possa invadir uma célula mamífera, suas moléculas de superfície devem interagir com as proteínas da célula hospedeira (Thiakaki *et al.*, 2006). As proteínas de superfície são, na maioria das vezes, as grandes responsáveis pela virulência de organismos que causam as doenças, e por isso, muito utilizadas na preparação de vacinas. Algumas vacinas são constituídas por patógenos irradiados ou atenuados quimicamente (Daneshvar *et al.*, 2003). A atenuação da virulência apresenta um certo risco, pois existe a possibilidade dos agentes patogênicos atenuados sofrerem reativação ou mesmo escapar ao tratamento. Esses riscos são importantes devido à capacidade que muitos organismos têm de produzir doenças graves. Uma alternativa, que tem sido empregada com sucesso, é o isolamento de moléculas, particularmente proteínas, da membrana de agentes patogênicos e a sua reconstituição em lipossomos (Daghastanli *et al.*, 2004; Afrin *et al.*, 2000; Afrin & Ali, 1997; Ali & Afrin, 1997). Por esse processo, tenta-se preservar as características estruturais desejáveis para sua antigenicidade, sem o perigo da patogenicidade.

Como as técnicas utilizadas para isolar e purificar as proteínas de membrana são bastante drásticas, podendo causar a desorganização da estrutura nativa da proteína, a principal preocupação nesses estudos é a de preservar a estrutura protéica e, conseqüentemente, a sua função, para que estas não sejam alteradas ou perdidas, após os procedimentos de solubilização e purificação (le Maire *et al.*, 2000). Uma maneira de impedir a desnaturação dessas proteínas é reincorporá-las em uma estrutura que mimetize a membrana plasmática, um processo conhecido como reconstituição (Rigaud, 2002). A reconstituição de proteínas de membrana em lipossomos revelou-se uma alternativa viável para a preparação de

componentes antigênicos visando à indução de imunidade (imunogenicidade) em animais de experimentação (Leserman, 2004). Além de preservar a estrutura nativa das proteínas, os lipossomos apresentam a vantagem de conferir uma atividade de adjuvante nas vacinas contra vários patógenos (Laing *et al.*, 2006; Daghasanli *et al.*, 2004).

Como os componentes da membrana da *Leishmania* estão associados com a sua patogenicidade, acredita-se que a geração de uma resposta imune contra esses componentes possa levar ao desenvolvimento da imunoprevenção contra a leishmaniose (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Nós escolhemos a forma amastigota de *L. amazonensis* como fonte de antígenos para a preparação da vacina desenvolvida neste trabalho porque a amastigota é a responsável pela patologia associada com a doença. Além disso, alguns protocolos de imunização que utilizaram as proteínas da forma amastigota apresentaram resultados bastante promissores. Em 1995, Soong e colaboradores purificaram três antígenos específicos da forma amastigota (A2, P4 e P8) e a imunização com P8 induziu proteção total em camundongos BALB/c desafiados com *L. pifanoi* e proteção parcial nos animais desafiados com *L. amazonensis*. Antígenos de amastigota de *L. amazonensis* em combinação com o adjuvante ONO-4007 (um análogo sintético do lipídeo A) foram utilizados tanto na imunoterapia como na imunoprevenção e a porcentagem de proteção foi de 40 e 60 %, respectivamente (Calvopina *et al.*, 2006). O antígeno A2 recombinante foi capaz de induzir proteção em camundongos BALB/c contra a infecção pela *L. amazonensis*. Essa vacina, que utilizou IL-12 recombinante como um adjuvante, perdia a sua eficácia quando combinada com o antígeno LACK (Coelho *et al.*, 2003).

O sucesso para a reconstituição das proteínas de membrana em lipossomos envolve três aspectos: (i) a solubilização completa ou parcial dos componentes lipídicos e protéicos da membrana, (ii) a preservação da atividade biológica das proteínas solubilizadas e (iii) a proporção ideal entre as proteínas solúveis purificadas e os lipídeos para alcançar a melhor

reconstituição (Rigaud *et al.*, 1995). Durante o processo de reconstituição, as proteínas de membrana devem estar acessíveis para que ocorra a incorporação nos lipossomos. Os detergentes são fundamentais para o isolamento das proteínas integrais e esse processo de solubilização é afetado tanto pelo caráter iônico como pela concentração micelar crítica (CMC) do detergente (Seddon *et al.*, 2004; le Maire *et al.*, 2000).

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um sistema carreador de proteínas antigênicas da forma amastigota de *L. amazonensis*, empregando-se lipossomos e, com isso, verificar se os proteolipossomos eram capazes de proteger camundongos isogênicos contra a leishmaniose cutânea experimental. Como mencionado, para que as proteínas sejam incorporadas nos lipossomos elas devem estar solúveis. Sendo assim, nós investigamos a eficácia de cinco detergentes diferentes no processo de solubilização das proteínas de membrana da *L. amazonensis*. Dentre os detergentes usados, o SDS foi o mais eficiente nesse processo, sendo responsável pela recuperação de 93 % de proteínas solúveis quando utilizado na concentração de 0,1 % (**Figura 3**). Concentrações maiores do SDS não promoveram um melhor rendimento na solubilização do extrato bruto (**Figura 6**). Esse detergente também já havia se mostrado muito eficiente durante a solubilização das proteínas de membrana da *Pasteurella multocida*. Nesse trabalho, o SDS solubilizou 85 % das proteínas presentes na fração de membrana (Daghastanli *et al.*, 2004).

Embora o SDS seja altamente desnaturante, o tratamento do extrato bruto com esse detergente não afetou de forma considerável a sua capacidade de ligação com os anticorpos gerados contra os determinantes antigênicos de *L. amazonensis* (**Figura 4B, canaleta 2**).

Escolhido o detergente e a sua concentração, outros parâmetros foram variados na tentativa de se aperfeiçoar o processo de solubilização. Além da concentração do extrato bruto, nós também avaliamos o efeito da temperatura e do tempo de incubação do extrato bruto com o SDS no processo de solubilização. Após todos os testes, nós optamos por um

protocolo em que a solubilização das proteínas de membrana de amastigotas de *L. amazonensis* seria realizada com SDS 0,1 % e 0,5 mg/mL do extrato bruto, sem período de incubação. Para recuperar as proteínas solúveis do extrato bruto, esse material foi centrifugado a 4°C. Determinadas as condições adequadas para a solubilização das proteínas de membrana da *Leishmania*, o próximo passo foi realizar estudos sistemáticos para definir a melhor condição para a reconstituição do EBS em lipossomos.

O mecanismo de formação dos proteolipossomos é complexo e extremamente importante para a reconstituição correta de proteínas na membrana lipídica. Quatro técnicas principais para a reconstituição da proteína na membrana artificial podem ser encontradas na literatura (Rigaud *et al.*, 1995). A reconstituição mediada por solvente orgânico é uma das técnicas utilizadas para preparar os proteolipossomos. No entanto, essa técnica é pouco utilizada porque normalmente desnatura as proteínas de membrana. Os proteolipossomos também podem ser formados através de métodos mecânicos. A principal vantagem desse método é a rapidez, já as maiores desvantagens encontradas são a não reprodutibilidade do ensaio, a inativação de muitas proteínas devido ao longo processo de sonicação e também o pequeno diâmetro dos proteolipossomos resultantes (Rigaud *et al.*, 1995). Uma técnica alternativa é a incorporação direta da proteína de membrana em lipossomos pré-formados. A principal desvantagem desse método é a exigência da remoção total do detergente da amostra protéica antes da incubação com o lipossomo previamente preparado o que, eventualmente, pode favorecer o aparecimento de agregados. O método de co-solubilização é a estratégia de reconstituição de proteínas de membrana que tem apresentado melhores resultados e portanto, mais freqüentemente utilizado (Rigaud *et al.*, 1995).

Dentre as diversas metodologias utilizadas para a obtenção de proteolipossomos nós adotamos a de co-solubilização. Ter escolhido essa metodologia foi importante porque a mesma não exige a retirada prévia do detergente presente na amostra a ser reconstituída nos lipossomos,

evitando a precipitação das proteínas solubilizadas. Na metodologia escolhida, o detergente é removido da amostra quando a mesma estiver na presença dos lipossomos. Nessa etapa, a completa remoção do detergente é essencial para que os proteolipossomos se formem.

Na técnica de co-solubilização, a remoção do detergente pode ser realizada de diversas formas. Entre os métodos usuais, a resina hidrofóbica é a preferida porque é rápida e não dilui a amostra (Rigaud *et al.*, 1998). A desvantagem desse método é que uma quantidade significativa de proteína e/ou lipídeo também pode ser adsorvida pela resina durante o processo de reconstituição. Porém, esse problema pode ser minimizado pela exposição da mistura a intervalos de tempo curtos e repetitivos com a resina. Como descrito por Daghasanli e colaboradores (2004), a remoção do SDS pode chegar a 99 % com o uso da resina Calbiosorb[®]. Assim, nós também utilizamos essa resina para remover o detergente e, conseqüentemente, reconstituir o EBS nos lipossomos.

O sucesso na reconstituição de proteínas de membrana em lipossomos pode ser influenciado também pela natureza dos lipídeos escolhidos. Dessa forma, um passo importante para alcançar um bom rendimento na incorporação das proteínas nesses sistemas vesiculares é o estabelecimento da composição lipídica mais apropriada. Nós preparamos proteolipossomos com DPPC, DPPS e colesterol com diferentes razões em massa. A melhor incorporação das proteínas presentes no EBS ocorreu quando nós utilizamos DPPC, DPPS e colesterol na razão em massa de 5:1:4 (**Tabela II**). Nessas condições, a incorporação das proteínas foi de 60 % e os proteolipossomos resultantes formaram uma população homogênea com diâmetro médio de 140 nm (**Figura 10**). A porcentagem de incorporação das proteínas caía quando alterações eram feitas na proporção descrita acima (**Tabela II**). Uma banda protéica com massa molecular em torno de 60 kDa foi preferencialmente incorporada nos proteolipossomos preparados com 1 mg DPPC:1 mg DPPS:5 mg colesterol (**Figura 11, canaleta 5**). Por outro lado, os outros proteolipossomos apresentaram um perfil eletroforético

similar ao do EBS (**Figura 11, canaletas 1, 2, 3 e 4**). Esses resultados indicam que um aumento na quantidade de colesterol provoca uma incorporação seletiva de proteínas na estrutura micelar.

Algumas proteínas se associam preferencialmente com microdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol, conhecidos como *lipid rafts* (Almeida *et al.*, 2005). As proteínas ancoradas por GPI (glicosil fosfatidil inositol) são preferencialmente localizadas nesses domínios. Em 2001, Denny e colaboradores demonstraram que essas regiões estão presentes em *Leishmania*, e que o antígeno gp63, ancorado por GPI, está presente nos *lipid rafts*. Os nossos resultados sugerem que os proteolipossomos preparados com 1 mg DPPC:1 mg DPPS:5 mg colesterol podem incorporar seletivamente proteínas da *Leishmania* localizadas nesses microdomínios.

O mecanismo pelo qual os lipossomos exercem seu efeito adjuvante ainda não está bem compreendido, mas acredita-se que a imunogenicidade dos lipossomos é influenciada pela carga dos lipídeos utilizados na preparação dessas vesículas. Por exemplo, lipossomos contendo fosfatidilserina são mais eficientes em induzir a produção de IFN- γ pelas células de baço de camundongos do que aqueles contendo fosfolipídeos neutros (Aramaki *et al.*, 1995). Em um outro trabalho, os antígenos de membrana de promastigotas de *L. donovani* reconstituídos em lipossomos induziram níveis significativos de proteção em hamsters e em camundongos BALB/c. Em camundongos, o grau de proteção conferido por esses antígenos foi dependente da carga dos proteolipossomos (Afrin *et al.*, 2000; Afrin & Ali, 1997; Ali & Afrin, 1997).

Nós adicionamos a fosfatidilserina em nosso protocolo porque lipossomos contendo esse fosfolipídeo, além de induzir a produção de IFN- γ , são também capazes de estimular a produção de IL-12 pelas células murinas do baço (Yotsumoto *et al.*, 2004). Além disso, lipossomos contendo fosfatidilserina tem como alvo as células que possuem receptores

scavenger, como por exemplo, os macrófagos (Peiser *et al.*, 2002). Em 2004, Tempone e colaboradores demonstraram que o antimonial pentavalente encapsulado em lipossomos que continha fosfatidilserina era capturado de maneira muito eficaz pelos macrófagos infectados com *L. chagasi*.

Após a caracterização dos proteolipossomos constituídos de 5 mg DPPC:1 mg DPPS:4 mg colesterol, avaliamos a atividade protetora dessa preparação. A primeira estratégia foi investigar a melhor via de inoculação dos proteolipossomos e, para isso, os camundongos foram imunizados com as preparações tanto pela via s.c. como pela via i.p. Os camundongos receberam duas imunizações com intervalo de três semanas e duas semanas após a última imunização foram desafiados por via s.c. na pata traseira direita com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis*. Em 1997, Lezama-Davila demonstrou que a imunização de camundongos com antígenos da superfície de *L. mexicana* incorporados em lipossomos era mais eficiente pela via i.p. do que pela s.c. Por outro lado, camundongos BALB/c imunizados pela via s.c. com o antígeno LmSTII recombinante encapsulado em lipossomos tiveram uma proteção significativa após o desafio com *L. major* (Badiee *et al.*, 2007). No nosso trabalho, a via i.p. também se mostrou mais eficiente na indução da imunidade protetora (**Figura 16**).

Quando administrados pela via s.c., além de não conferir proteção alguma, os proteolipossomos levaram a uma exacerbação da doença (**Figura 16**). Como demonstrado por Pinheiro e colaboradores em 2005, o aumento na suscetibilidade dos animais pode estar relacionado com uma maior produção de TGF- β (fator β de crescimento e transformação). Os autores do trabalho demonstraram que os camundongos BALB/c vacinados intramuscularmente com antígenos de *L. amazonensis* se tornavam mais suscetíveis após o desafio com a mesma espécie de *Leishmania* devido ao aumento na produção de TGF- β .

A imunização i.p. dos camundongos BALB/c com 20 μ g proteolipossomos conferiu uma proteção apenas no início da doença e essa proteção foi decaindo nas semanas seguintes,

até se tornar insignificante no final do experimento (**Figura 16**). Para tentar melhorar essa proteção conferida pelos proteolipossomos inoculados pela via i.p., nós decidimos variar alguns parâmetros. Dentre esses podemos citar: a concentração dos proteolipossomos, a quantidade de imunizações e o intervalo entre a imunização e o desafio. Assim, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram imunizados uma única vez com 10, 20 ou 40 µg de proteolipossomos e após três semanas foram desafiados com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* na pata traseira direita.

O novo protocolo utilizado melhorou a proteção conferida pelos proteolipossomos. Para notar essa melhora, basta comparar o grupo dos camundongos BALB/c que recebeu 20 µg de proteolipossomos antes e depois da modificação no protocolo de imunização. Como podemos observar na **Figura 16**, os animais imunizados com 20 µg da vacina tiveram um nível de proteção de 14 %, após 10 semanas de infecção. Após a mudança no protocolo de imunização, essa proteção passou para 30 % no mesmo período de infecção (**Figura 18**). Isso indica que uma dose da vacina foi suficiente para induzir algum nível de proteção nos camundongos BALB/c, não havendo a necessidade de um reforço. Além disso, uma proteção dose dependente foi observada durante o curso de infecção dos camundongos BALB/c previamente imunizados com os proteolipossomos.

Como a melhor proteção foi conseguida após o inóculo i.p. da maior concentração da vacina, o próximo passo foi investigar se concentrações maiores que 40 µg poderiam ser mais eficientes na proteção contra a leishmaniose cutânea experimental. Para tentar melhorar ainda mais o nível de proteção, nós também diminuimos a quantidade de parasitas utilizada no desafio dos camundongos previamente imunizados. Em 1995, Soong e colaboradores demonstraram que a proteção contra a *L. pifanoi* conferida após a imunização dos camundongos BALB/c com o antígeno A2 era dependente da quantidade de parasitas inoculados no desafio. Nós utilizamos 10^4 e 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* para fazer o desafio dos animais. Essa quantidade de parasitas é bem inferior do que a normalmente

utilizada nos estudos de vacinação contra a leishmaniose. Porém, sabe-se que na natureza a quantidade de promastigotas metacíclicas inoculadas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo varia de 10 a 1000 formas (Kamhawi, 2006; Sacks, 1989).

Ao diminuirmos a quantidade de parasitas no desafio, de 10^6 (**Figuras 17A e 18**) para 10^5 (**Figura 20**), não melhoramos a proteção dos camundongos BALB/c previamente imunizados com 40 μ g de proteolipossomos. Da oitava até a décima segunda semana de infecção, uma proteção em torno de 50 % foi observada tanto nos animais desafiados com 10^6 como nos desafiados com 10^5 parasitas. Já os animais imunizados com 80 ou 120 μ g de proteolipossomos tiveram um nível de proteção em torno de 87 % na décima segunda semana de infecção após o desafio com 10^5 parasitas (**Figura 20**). A melhor proteção foi alcançada no grupo imunizado com 120 μ g de proteolipossomos e desafiado com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis* (**Figuras 21 e 22**). Esses animais não desenvolveram nenhuma lesão durante os nove meses de experimento, o que indica uma proteção de 100 %. Esses resultados indicam que a proteção induzida pelos proteolipossomos é dependente da quantidade de parasitas inoculados no momento do desafio e também da concentração dos proteolipossomos. Quanto maior a concentração da vacina, maior a proteção contra a infecção pela *L. amazonensis*.

O papel das citocinas na resistência e suscetibilidade durante a infecção experimental com *L. major* está claramente definido: a produção de IL-4 pelos camundongos BALB/c leva a suscetibilidade enquanto que, a produção de IFN- γ dependente de IL-12 culmina com a ativação do macrófago e controle do crescimento do parasita nas linhagens resistentes (Sacks & Noben-Trauth, 2002). A IL-12 induz a produção de IFN- γ pelas células NK e pelas células T (**Figura 2**), sendo essencial para promover a diferenciação e a proliferação das células Th1 e também para ligar a resposta imune inata com a adaptativa (Manetti *et al.*, 1993). Camundongos geneticamente deficientes para o receptor de IL-12 são suscetíveis durante uma infecção com *L. major* e desenvolvem um padrão de resposta Th2 (Chakir *et al.*, 2003). Em

2006, Hernández e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 IL-12 KO são mais suscetíveis durante uma infecção com *L. amazonensis*.

Além da IL-12, o IFN- γ também desempenha um papel essencial durante o controle da infecção por *L. amazonensis*. Camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *L. braziliensis* são capazes de controlar a infecção. Por outro lado, eles desenvolvem lesões crônicas com um elevado número de parasitas, quando infectados com *L. amazonensis* (Jones *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2000). Maioli e colaboradores (2004) demonstraram que essa diferença no controle do parasita está associada com a diminuição na produção de IFN- γ pelas células do linfonodo dos animais infectados com *L. amazonensis*. Apesar da suscetibilidade que os camundongos da linhagem C57BL/6 demonstram durante a infecção com *L. amazonensis*, os camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem lesões muito maiores quando infectados com essa espécie de *Leishmania*. Uma maior produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ explica a maior resistência encontrada nos camundongos C57BL/6 durante a infecção pela *L. amazonensis* (Chan, 1993). Em outro trabalho, Colmenares e colaboradores (2003) demonstraram que o antígeno P8 é capaz de proteger camundongos da linhagem C57BL/6 contra a infecção desenvolvida pela *L. amazonensis* e essa proteção é mediada pelas células T CD8⁺ presentes no sítio da infecção que secretam IFN- γ e perforina.

Os dados da literatura comentados acima indicam claramente a importância de IFN- γ e IL-12 para o controle da infecção desenvolvida pela *L. amazonensis*. Com base nesses dados, nós avaliamos a importância *in vivo* dessas duas citocinas na proteção induzida pela imunização com os proteolipossomos. Em 2006, Hernández e colaboradores demonstraram que uma proteção parcial contra a infecção por *L. amazonensis* pode ser induzida pela Leishvacin[®] na ausência de IL-12. Nossos achados indicam o oposto, pois a proteção em torno de 50 % nos camundongos WT que receberam a vacina foi perdida nos animais

deficientes tanto para IL-12 como para IFN- γ (**Figura 23**). Esses resultados indicam que a proteção induzida pela vacina desenvolvida neste trabalho é dependente dessas citocinas.

6 - CONCLUSÕES

1. As proteínas de membrana da forma amastigota de *L. amazonensis* foram eficientemente solubilizadas após o tratamento com SDS, um detergente aniônico com propriedades desnaturantes. Quando detergentes zwitteriônicos (CHAPS e CHAPSO) ou neutros (Tween 20 e Polidocanol) são utilizados, a recuperação das proteínas solúveis é 36 % menor, quando comparada com o rendimento após o tratamento com o SDS.
2. Lipossomos preparados com DPPC, DPPS e colesterol na proporção de 5:1:4 foram eficazes no processo de reconstituição das proteínas solúveis da forma amastigota de *L. amazonensis*. Os proteolipossomos resultantes apresentam um diâmetro médio de 140 nm e uma taxa de incorporação de proteína de 60 %.
3. Esses proteolipossomos foram capazes de induzir uma proteção parcial contra o desafio com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* em camundongos da linhagem C57BL/6, previamente imunizados pela via i.p. com 40 µg dessas vesículas lipídicas.
4. Os proteolipossomos apresentaram também a capacidade de induzir proteção total por um período de 39 semanas em camundongos da linhagem BALB/c, previamente vacinados com 120 µg de proteolipossomos e desafiados com 10^4 promastigotas de *L. amazonensis*.
5. Os proteolipossomos não protegeram camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes para IL-12 ou IFN- γ . Esses achados indicam que a proteção observada contra a *L. amazonensis*, por meio da vacinação com os proteolipossomos, é dependente dessas citocinas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afrin, F., Anam, K. and Ali, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. **J Parasitol**, 86: 730-735, 2000.
- Afrin, F. and Ali, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. **Infect Immun**, 65: 2371-2377, 1997.
- Alexander, J. and Bryson, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett**, 99: 17-23, 2005.
- Alexander, J., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J Immunol**, 161: 6794-6801, 1998.
- Ali, N. and Afrin, F. Protection of mice against visceral leishmaniasis by immunization with promastigote antigen incorporated in liposomes. **J Parasitol**, 83: 70-75, 1997.
- Allison, A. G. and Gregoriadis, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, 252: 252, 1974.
- Almeida, P. F., Pokorny, A. and Hinderliter, A. Thermodynamics of membrane domains. **Biochim Biophys Acta**, 1720: 1-13, 2005.
- Almeida-Campos, F. R. and Horta, M. F. Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. **Mol Biochem Parasitol**, 111: 363-375, 2000.
- Almeida-Campos, F. R., Noronha, F. S. and Horta, M. F. The multitasking pore-forming proteins of intracellular pathogens. **Microbes Infect**, 4: 741-750, 2002.
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L. and Griffiths, G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, 61: 1277-1287, 1990.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T. and Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol**, 6: 392-401, 1998.
- Aramaki, Y., Suda, H. and Tsuchiya, S. Interferon- γ inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. **Vaccine**, 13: 1809-1814, 1995.
- Armijos, R. X., Weigel, M. M., Calvopina, M., Hidalgo, A., Cevallos, W. and Correa, J. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, 22: 1320-1326, 2004.
- Badiee, A., Jaafari, M. R. and Khamesipour, A. *Leishmania major*: immune response in BALB/c mice immunized with stress-inducible protein 1 encapsulated in liposomes. **Exp Parasitol**, 115: 127-134, 2007.
- Bahar, K., Dowlati, Y., Shidani, B., Alimohammadian, M. H., Khamesipour, A., Ehsasi, S., Hashemi-Fesharki, R., Ale-Agha, S. and Modabber, F. Comparative safety and

immunogenicity trial of two killed *Leishmania major* vaccines with or without BCG in human volunteers. **Clin Dermatol**, 14: 489-495, 1996.

Beebe, A. M., Mauze, S., Schork, N. J. and Coffman, R. L. Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. **Immunity**, 6: 551-557, 1997.

Belkaid, Y., Blank, R. B. and Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunol Rev**, 212: 287-300, 2006.

Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. and Sacks, D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J Immunol**, 168: 3992-4000, 2002.

Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gumy, A., Egeter, O., Sakrauski, A. K., Seegmuller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A. D., Wagner, H., Heeg, K., Louis, J. A. and Rocken, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nat Immunol**, 2: 1054-1060, 2001.

Blackwell, J. M., Ezekowitz, R. A., Roberts, M. B., Channon, J. Y., Sim, R. B. and Gordon, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J Exp Med**, 162: 324-331, 1985.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.

Brittingham, A., Chen, G., McGwire, B. S., Chang, K. P. and Mosser, D. M. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect Immun**, 67: 4477-4484, 1999.

Brodskyn, C. I., DeKrey, G. K. and Titus, R. G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infect Immun**, 69: 665-672, 2001.

Bryceson, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Trop Med Int Health**, 6: 928-934, 2001.

Calvopina, M., Barroso, P. A., Marco, J. D., Korenaga, M., Cooper, P. J., Nonaka, S. and Hashiguchi, Y. Efficacy of vaccination with a combination of *Leishmania* amastigote antigens and the lipid A-analogue ONO-4007 for immunoprophylaxis and immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in a murine model of New World cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, 24: 5645-5652, 2006.

Chakir, H., Campos-Neto, A., Mojibian, M. and Webb, J. R. IL-12R β 2-deficient mice of a genetically resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection and develop a parasite-specific Th2 immune response. **Microbes Infect**, 5: 241-249, 2003.

Chan, M. M. T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infection: production of interferon-gamma by CD8+ cells. **Eur J Immunol**, 23: 1181-1184, 1993.

Chen Jr, P. S., Toribara, T. Y. and Warner, H. Microdetermination of phosphorus. **Anal Chem**, 28: 1756-1758, 1956.

Chikh, G. and Schutze-Redelmeier, M. P. Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells. **Biosci Rep**, 22: 339-353, 2002.

Chulay, J. D., Spencer, H. C. and Mugambi, M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am J Trop Med Hyg**, 34: 702-709, 1985.

Coelho, E. A., Tavares, C. A., Carvalho, F. A., Chaves, K. F., Teixeira, K. N., Rodrigues, R. C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R. T. and Fernandes, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immun**, 71: 3988-3994, 2003.

Coler, R. N., Skeiky, Y. A., Bernards, K., Greeson, K., Carter, D., Cornellison, C. D., Modabber, F., Campos-Neto, A. and Reed, S. G. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infect Immun**, 70: 4215-4225, 2002.

Colmenares, M., Kima, P. E., Samoff, E., Soong, L. and McMahon-Pratt, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect Immun**, 71: 3172-3182, 2003.

Courret, N., Frehel, C., Prina, E., Lang, T. and Antoine, J. C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, 122: 263-279, 2001.

Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W. and Chan, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**, 36: 2633-2636, 1987.

Cruz, A., Coburn, C. M. and Beverley, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 7170-7174, 1991.

Daghashtanli, K. R., Ferreira, R. B., Thedei Jr, G., Maggio, B. and Ciancaglini, P. Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 36: 127-137, 2004.

Daneshvar, H., Coombs, G. H., Hagan, P. and Phillips, R. S. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. **J Infect Dis**, 187: 1662-1668, 2003.

Da Silva, R. P., Hall, B. F., Joiner, K. A. and Sacks, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J Immunol**, 143: 617-622, 1989.

Del Giudice, G., Podda, A. and Rappuoli, R. What are the limits of adjuvanticity? **Vaccine**, 20: 38-41, 2001.

Denise, H., McNeil, K., Brooks, D. R., Alexander, J., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect Immun**, 71: 3190-3195, 2003.

Denny, P. W., Field, M. C. and Smith, D. F. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. **FEBS Lett**, 491: 148-153, 2001.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 27: 305-318, 2004.

DPDx-Division of Parasitic Diseases. Leishmaniasis. Life cycle. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm> - Acessado em: 12/12/2006.

el-On, J. and Hamburger, A. D. Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81: 734-737, 1987.

Escobar, P., Matu, S., Marques, C. and Croft, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop**, 8: 151-157, 2002.

Evans, T. G., Thai, L., Granger, D. L. and Hibbs Jr, J. B. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J Immunol**, 151: 907-915, 1993.

Foote, S. J. and Handman, E. Genetics of murine leishmaniasis. **Brief Funct Genomic Proteomic**, 4: 270-276, 2005.

Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S. and Campos-Neto, A. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**, 36: 827-838, 2005.

Gasser, R. A., Magill, A. J., Oster, C. N., Franke, E. D., Grogl, M. and Berman, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, 18: 83-90, 1994.

Genaro, O., de Toledo, V. P., da Costa, C. A., Hermeto, M. V., Afonso, L. C. and Mayrink, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clin Dermatol**, 14: 503-512, 1996.

Ghosh, A., Zhang, W. W. and Matlashewski, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, 20: 59-66, 2002.

Greenblatt, C. L. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. **Prog Clin Biol Res**, 47: 259-285, 1980.

Grundy, I. Montagu's variolation. **Endeavour**, 24: 4-7, 2000.

- Haidaris, C. G. and Bonventre, P. F. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. **J Immunol**, 129: 850-855, 1982.
- Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, 48: 422-427, 1972.
- Henriques, C., Atella, G. C., Bonilha, V. L. and de Souza, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, 89: 123-133, 2003.
- Hepburn, N. C., Siddique, I., Howie, A. F., Beckett, G. J. and Hayes, P. C. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. **Lancet**, 342: 238-239, 1993.
- Hernández, M. X., Barcante, T. A., Vilela, L., Tafuri, W. L., Afonso, L. C. and Vieira, L. Q. Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. **Immunol Lett**, 105: 38-47, 2006.
- Herwaldt, B. L. and Berman, J. D. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. **Am J Trop Med Hyg**, 46: 296-306, 1992.
- Higgins, G. Separation and analysis of membrane lipid components. In: J. B. C. Findlay, W. H. Evans, editors. *Biological Membranes. Practical Approach Series*, IRL Press, Oxford, 104-137, 1987.
- Himmelrich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., Louis, J. A. and Launois, P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4⁺ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **J Immunol**, 161: 6156-6163, 1998.
- Horta, M. F. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. **Trends Microbiol**, 5: 363-366, 1997.
- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Alonso, C. and Requena, J. M. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, 22: 3865-3876, 2004.
- Ilg, T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. **EMBO J**, 19: 1953-1962, 2000.
- Jaafari, M. R., Ghafarian, A., Farrokh-Gisour, A., Samiei, A., Kheiri, M. T., Mahboudi, F., Barkhordari, F., Khamesipour, A. and McMaster, W. R. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. **Vaccine**, 24: 5708-5717, 2006.
- Jones, D. E., Ackermann, M. R., Wille, U., Hunter, C. A. and Scott, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect Immun**, 70: 2151-2158, 2002.

Jones, D. E., Buxbaum, L. U. and Scott, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, 165: 364-372, 2000.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, 22: 439-445, 2006.

Kedzierski, L., Montgomery, J., Bullen, D., Curtis, J., Gardiner, E., Jimenez-Ruiz, A. and Handman, E. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. **J Immunol**, 172: 4902-4906, 2004.

Khalil, E. A., Ayed, N. B., Musa, A. M., Ibrahim, M. E., Mukhtar, M. M., Zijlstra, E. E., Elhassan, I. M., Smith, P. G., Kieny, P. M., Ghalib, H. W., Zicker, F., Modabber, F. and Elhassan, A. M. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, 140: 349-353, 2005.

Khalil, E. A., El Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., Musa, B., Ibrahim, M. E., Kamil, A. A., Elsheikh, M., Babiker, A. and Modabber, F. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **Lancet**, 356: 1565-1569, 2000.

Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol**, 4: 1-24, 1990.

Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H. and Unger, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, 36: 1630-1634, 1992.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

Laing, P., Bacon, A., McCormack, B., Gregoriadis, G., Frisch, B. and Schuber, F. The 'co-delivery' approach to liposomal vaccines: application to the development of influenza-A and hepatitis-B vaccine candidates. **J Liposome Res**, 16: 229-235, 2006.

Lainson, R. and Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (Editors). **The leishmaniasis in biology and medicine**. Academic Press, 1-120, 1987.

le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim Biophys Acta**, 1508: 86-111, 2000.

Leserman, L. Liposomes as protein carriers in immunology. **J Liposome Res**, 14: 175-189, 2004.

Lezama-Davila, C. M. Vaccination of different strains of mice against cutaneous leishmaniasis: usefulness of membrane antigens encapsulated into liposomes by intraperitoneal and subcutaneous administration. **Arch Med Res**, 28: 47-53, 1997.

Machado-Pinto, J., Pinto, J., da Costa, C. A., Genaro, O., Marques, M. J., Modabber, F. and Mayrink, W. Immunotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using

killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **Int J Dermatol**, 41: 73-78, 2002.

Maioli, T. U., Takane, E., Arantes, R. M., Fietto, J. L. and Afonso, L. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitol Res**, 94: 207-212, 2004.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G. and Romagnani, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J Exp Med**, 177: 1199-1204, 1993.

Manickasingham, S. P., Edwards, A. D., Schulz, O. and Reis e Sousa, C. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. **Eur J Immunol**, 33: 101-107, 2003.

Markle, W. H. and Makhoul, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. **Am Fam Physician**, 69: 1455-1460, 2004.

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. and Rezende, S. A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitol Res**, 98: 67-74, 2005.

Masina, S., Gicheru, M. M., Demotz, S. O. and Fasel, N. J. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. **J Infect Dis**, 188: 1250-1257, 2003.

McMahon-Pratt, D. and Alexander, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev**, 201: 206-224, 2004.

McMahon-Pratt, D., Traub-Cseko, Y., Lohman, K. L., Rogers, D. D. and Beverley, S. M. Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. **Mol Biochem Parasitol**, 50: 151-160, 1992.

McNeely, T. B. and Turco, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **J Immunol**, 144: 2745-2750, 1990.

Meyerhoff, A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, 28: 42-48; discussion 49-51, 1999.

Misra, A., Dube, A., Srivastava, B., Sharma, P., Srivastava, J. K., Katiyar, J. C. and Naik, S. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. **Vaccine**, 19: 3485-3492, 2001.

Mohebali, M., Khamesipour, A., Mobedi, I., Zarei, Z. and Hashemi-Fesharki, R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine

mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. **Vaccine**, 22: 4097-4100, 2004.

Momeni, A. Z., Jalayer, T., Emamjomeh, M., Khamesipour, A., Zicker, F., Ghassemi, R. L., Dowlati, Y., Sharifi, I., Aminjavaheri, M., Shafiei, A., Alimohammadian, M. H., Hashemi-Fesharki, R., Nasser, K., Godal, T., Smith, P. G. and Modabber, F. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, 17: 466-472, 1999.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, 7: 145-173, 1989.

Muller, I., Kropf, P., Louis, J. A. and Milon, G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. **Infect Immun**, 62: 2575-2581, 1994.

Murray, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J Immunol**, 129: 351-357, 1982.

Mussi, S. V., Fernandes, A. P. and Ferreira, L. A. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitol Res**, 100: 1221-1226, 2007.

Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidruni, G. and Ghorbani, M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, 76: 377-383, 1983.

Noronha, F. S., Ramalho-Pinto, F. J. and Horta, M. F. Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: involvement of a putative pore-forming protein. **Infect Immun**, 64: 3975-3982, 1996.

Noronha, F. S., Ramalho-Pinto, F. J. and Horta, M. F. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. **Braz J Med Biol Res**, 27: 477-482, 1994.

Olobo, J. O., Anjili, C. O., Gicheru, M. M., Mbatia, P. A., Kariuki, T. M., Githure, J. I., Koech, D. K. and McMaster, W. R. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania major* surface glycoprotein' (gp63). **Vet Parasitol**, 60: 199-212, 1995.

Padigel, U. M., Alexander, J. and Farrell, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **J Immunol**, 171: 3705-3710, 2003.

Papadopoulou, B., Roy, G., Breton, M., Kundig, C., Dumas, C., Fillion, I., Singh, A. K., Olivier, M. and Ouellette, M. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioperin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. **Infect Immun**, 70: 62-68, 2002.

Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, 14: 123-128, 2002.

Peters, N. and Sacks, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol Rev**, 213: 159-179, 2006.

Peters, W. 'The little sister' - a tale of Arabia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 82: 179-184, 1987.

Pinheiro, R. O., Pinto, E. F., Lopes, J. R., Guedes, H. L., Fentanes, R. F. and Rossi-Bergmann, B. TGF- β -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. **Microbes Infect**, 7: 1317-1323, 2005.

Rafati, S., Zahedifard, F. and Nazgouee, F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 24: 2169-2175, 2006.

Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A. and Larraga, V. 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, 2003.

Read, S. M. and Northcote, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal Biochem**, 116: 53-64, 1981.

Rigaud, J. L., Levy, D., Mosser, G. and Lambert, O. Detergent removal by non-polar polystyrene beads: Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization. **Eur Biophys J**, 27: 305-319, 1998.

Rigaud, J. L. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. **Braz J Med Biol Res**, 35: 753-766, 2002.

Rigaud, J. L., Pitard, B. and Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1231: 223-246, 1995.

Rittig, M. G. and Bogdan, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology**, 16: 292-297, 2000.

Rivier, D., Bovay, P., Shah, R., Didisheim, S. and Mael, J. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite Immunol**, 21: 461-473, 1999.

Sacks, D. and Anderson, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunol Rev**, 201: 225-238, 2004.

Sacks, D. and Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, 2: 845-858, 2002.

Sacks, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol**, 69: 100-103, 1989.

Santos, H. L. and Ciancaglini, P. A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions for solubilizing a membrane protein. **Biochem Educ**, 28: 178-182, 2000.

Saraiva, E. M., de Figueiredo Barbosa, A., Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Nico, D., Souza, L. O., de Oliveira Mendes-Aguiar, C., de Souza, E. P., Fampa, P., Parra, L. E., Menz, I., Dias Jr, J. G., de Oliveira, S. M. and Palatnik-de-Sousa, C. B. The FML-vaccine (Leishmune[®]) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, 24: 2423-2431, 2006.

Scott P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, 147: 3149-3155, 1991.

Seddon, A. M., Curnow, P. and Booth, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochim Biophys Acta**, 1666: 105-117, 2004.

Senekji, H. A. and Beattie, C. P. Artificial infection and immunization of man with cultures of *Leishmania tropica*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 34: 415-419, 1941.

Sharifi, I., FeKri, A. R., Aflatonian, M. R., Khamesipour, A., Nadim, A., Mousavi, M. R., Momeni, A. Z., Dowlati, Y., Godal, T., Zicker, F., Smith, P. G. and Modabber, F. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. **Lancet**, 351: 1540-1543, 1998.

Soong, L., Duboise, S. M., Kima, P. and McMahon-Pratt, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, 63: 3559-3566, 1995.

Spath, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J. and Beverley, S. M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97: 9258-9263, 2000.

Stager, S., Alexander, J., Carter, K. C., Brombacher, F. and Kaye, P. M. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infect Immun**, 71: 4804-4807, 2003.

Stager, S., Smith, D. F. and Kaye, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 165: 7064-7071, 2000.

Streit, J. A., Recker, T. J., Donelson, J. E. and Wilson, M. E. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. **Exp Parasitol**, 94: 33-41, 2000.

Strohl, E. L. The fascinating Lady Mary Wortley Montagu, 1689-1762. **Arch Surg**, 89: 554-558, 1964.

Tempone, A. G., Perez, D., Rath, S., Vilarinho, A. L., Mortara, R. A. and de Andrade Jr, H. F. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **J Antimicrob Chemother**, 54: 60-68, 2004.

Thiakaki, M., Kolli, B., Chang, K. P. and Soteriadou, K. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. **Microbes Infect**, 8: 1455-1463, 2006.

Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A. and Beverley, S. M. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92: 10267-10271, 1995.

Vélez, I. D., del Pilar Agudelo, S., Arbelaez, M. P., Gilchrist, K., Robledo, S. M., Puerta, J. A., Zicker, F., Berman, J. and Modabber, F. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 94: 698-703, 2000.

Vélez, I. D., Gilchrist, K., Arbelaez, M. P., Rojas, C. A., Puerta, J. A., Antunes, C. M., Zicker, F. and Modabber, F. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 593-598, 2005.

Veras, P., Brodskyn, C., Balestieri, F., Freitas, L., Ramos, A., Queiroz, A., Barral, A., Beverley, S. and Barral-Netto, M. A dhfr-ts- *Leishmania major* knock-out mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94: 491-496, 1999.

WHO-World Health Organization (2006). Disease information. Distribution. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm> - Acessado em: 05/12/2006.

Xu, D. and Liew, F. Y. Genetic vaccination against leishmaniasis. **Vaccine**, 12: 1534-1536, 1994.

Yotsumoto, S., Aramaki, Y., Kakiuchi, T. and Tsuchiya, S. Induction of antigen-dependent interleukin-12 production by negatively charged liposomes encapsulating antigens. **Vaccine**, 22: 3503-3509, 2004.

Zhang, W. W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., Clos, J., Sacks, D. L. and Matlashewski, G. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **J Biol Chem**, 278: 35508-35515, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **084/2005**, sobre o projeto intitulado “*Proteínas integrais de membrana de leishmania amazonensis incorporadas em lipossomos como modelo na imunoproteção à leishmaniose cutânea*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **30 de janeiro de 2006**.

(We certify that the protocol nº **084/2005**, about “*Leishmania amazonensis integral membrane proteins incorporated into liposomes as a model for immunoprotection in cutaneous leishmaniasis*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **01/30/2006** meeting).

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2006.

Prof. Dr. EDUARDO MAGALHÃES REGO
Decano da Comissão
de Ética em Experimentação Animal

ANEXO 2

Mimetic Membrane System to Carry Multiple Antigenic Proteins from *Leishmania amazonensis*

Fabiana R. Santos¹, Denise B. Ferraz¹, Katia R.P. Daghestanli², F. Juarez Ramalho-Pinto¹, Pietro Ciancaglini²

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

²Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 São Paulo, Brasil

Received: 24 January 2006/Accepted: 9 March 2006

Abstract. Liposomes have long been used as models for lipid membranes and for the reconstitution of a single or multiple proteins. Also, liposomes have adjuvant activity in vaccines against several protozoan or bacterial organisms. Thus, the main objective of the present study was to obtain a crude extract of detergent-solubilized proteins of *Leishmania amazonensis* amastigotes and reconstitute them into liposomes. Neutral and zwitterionic detergents were less efficient than an ionic detergent. In order to obtain efficient solubilization using only sodium dodecyl sulfate (SDS), the effects of detergent and protein concentration and incubation time were studied. The maximum of solubilized proteins was obtained instantaneously using a ratio of 0.5 mg/ml of protein to 0.1% (w/v) detergent at 4°C. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) and cholesterol in a weight ratio of 5:1:4 were used for protein reconstitution into liposomes using the cosolubilization method, yielding 60% of incorporation. The incorporation of multiple parasite proteins results in a vesicular diameter of proteoliposomes of about 140 nm, presenting a final lipid weight ratio for DPPC, DPPS and cholesterol of 1:1:5, with high stability. The detergent-solubilized proteins of *L. amazonensis* amastigotes present in the proteoliposome, when analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, include a wide range of parasite-incorporated proteins. BALB/c mice inoculated with these proteoliposomes were able to produce antibodies against the proteins reconstituted in DPPC:DPPS:cholesterol liposomes and were partially resistant to infection with *L. amazonensis* promastigotes. These results

indicate that this system can be used as a possible vaccine against *L. amazonensis*.

Key words: *Leishmania amazonensis* — Membrane protein — Detergent solubilization — Liposome — Proteoliposome — Cosolubilization method

Introduction

While lipids are the fundamental structural elements of cell membranes, proteins are responsible for carrying out specific membrane functions. When a foreign organism invades a mammalian cell, these molecules are important in the first contact with the host cell during the invasion of parasites (Mitchell et al., 2004; Hespanhol et al., 2005). To bypass the use of intact dead parasites to induce protective immunity into experimental animals, integral membrane proteins reconstituted in liposomes have been used (Lezama-Davila, 1997). Because the techniques used to recover membrane proteins may also disorganize the native protein structure, a challenge in many membrane studies is to ensure that the protein function is not altered or lost when removed from the membrane by solubilization and purification procedures (le Maire, Champeil & Moller, 2000). One approach to avoid membrane protein denaturation is to reincorporate these molecules back into a mimetic membrane structure, a process generally referred to as “reconstitution” (Rigaud, 2002). The reconstitution of membrane proteins into liposomes is a useful tool to prepare antigenic components to induce immunity in experimental models (de Jonge et al., 2004; Kita et al., 2005). In addition to preserving the active structure of proteins, liposomes have adjuvant

activity in vaccines against protozoan parasites (Afrin et al., 2002; Mazumdar, Anam & Ali, 2004; Uemura et al., 2005).

During their life cycle, the protozoan parasites of the genus *Leishmania* replicate and differentiate in the gut of the sandfly as flagellated promastigotes and are transmitted to a vertebrate by the vector. Survival of this parasite within the vertebrate host is dependent on successful entry into a macrophage and transformation of promastigotes into the amastigote form (Courret et al., 2001). During these processes, the surface of the parasite undergoes considerable changes to adapt alternatively to the different environments within the vertebrate and invertebrate hosts.

In the present study, we prepared a crude extract of detergent-solubilized proteins of *Leishmania amazonensis* amastigotes and reconstituted them into liposomes, employing the cosolubilization method (Seddon, Curnow & Booth, 2004; Daghestanli et al., 2004). The experiments were designed to study the effects of detergent and protein concentration, time and incubation temperature on *L. amazonensis* protein solubilization, followed by a standard procedure of proteoliposome construction. We further employed this material to induce an immune response in BALB/c mice and were able to show both an antibody response and significant protection from homologous infection. These results with proteoliposomes indicate a possible application of these mimetic membrane systems in the preparation of a putative vaccine against promastigotes of *L. amazonensis*.

Materials and Methods

MATERIALS

All solutions were prepared using Millipore (Bedford, MA) DirectQ ultrapure apyrogenic water. Tris(hydroxymethyl)amino-methane (TRIS), phosphate-buffered saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), Schneider' insect medium, molecular weight markers (10–205 kDa), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), 1,10-phenanthroline, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), cholesterol, sodium dodecyl sulfate (SDS), 3-([3-cholamidopropyl]dimethyl-ammonio)-1-propane sulfonate (CHAPS), 3-([3-cholamidopropyl]dimethyl-ammonio)-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO), polyoxyethylene 9-lauryl ether (Polidocanol), polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were purchased from Sigma (St. Louis, MO); peroxidase-labeled goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugate was from Southern Biotechnology (Birmingham, AL); Calbiosorb resin was from Calbiochem (San Diego, CA).

MICE AND PARASITES

Female BALB/c mice, 8–12 weeks old, were bred and maintained under standard conditions in the animal facility at the Faculdade

de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. The parasite strain IFLA/BR/67/PH8 of *L. amazonensis* was maintained in BALB/c mice (Noronha et al., 1998; Nunes et al., 1997). The amastigotes were isolated from footpad lesions of infected mice and transferred to Schneider's medium. The parasite suspension was centrifuged at $1,200 \times g$ for 10 min, and the pellets were collected and stored at -20°C .

PREPARATION OF CRUDE EXTRACT OF *L. AMAZONENSIS*

The frozen pellets of amastigotes were resuspended in 5 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.5), containing 1 mM EDTA, 1.6 mM PMSF, 0.1 mM E-64 and 1 mM 1–10 phenanthroline. The suspension was sonicated at 4°C with three 30-s blasts at 60 W.

ESTIMATION OF PROTEIN CONCENTRATION

Protein concentration was estimated in the presence of SDS 2.0% (w/v) by the procedure described by Hartree (1972), using crystallized BSA as standard. To estimate protein concentration in the fractions collected after isopycnic density gradient centrifugation, the method described by Read & Northcote (1981) was employed, also using crystallized BSA as standard.

ANTISERUM PREPARATION

BALB/c mice were infected subcutaneously in the hind footpad with 10^6 stationary growth phase *L. amazonensis* promastigotes. Two months after infection, the animals were bled and the antiserum against total *L. amazonensis* antigenic determinants was collected.

SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS AND WESTERN BLOTTING

The determination of the molecular weight of proteins was achieved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described by Laemmli (1970). Briefly, 5% polyacrylamide was used for the stacking gel and 10% for the running gel (1.0 mm thick). The gels were silver-stained to visualize the profile of the protein bands. Molecular weight markers ranged 10–205 kDa. Western blotting was performed by electrophoretically transferring the protein bands to a nitrocellulose membrane. The membrane was treated with blocking buffer (PBS, containing 5% [w/v] nonfat milk and 0.05% [v/v] Tween 20) for 1 h and probed with antiserum against total *L. amazonensis* at a dilution of 1:75 in the blocking buffer for 1 h. Excess proteins were removed with four washes of 5 min with washing buffer (PBS, containing 0.05% [v/v] Tween 20). Finally, the membrane was probed with peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG conjugate at a 1:1,000 dilution in the washing buffer. The DAB substrate was used to reveal protein-antibody interactions at the concentration of 0.5 mg/ml.

SOLUBILIZATION OF *L. AMAZONENSIS* MEMBRANE PROTEINS

Samples of crude extract of parasite (0.5 mg/ml of protein) were first incubated for 2 h at 25°C with different detergents in the concentration range of about 0.1–7% (w/v). Solubilized proteins were then separated by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h. Optimal solubilization condition was determined by changing protein or detergent concentration and incubation time of the protein sample with the detergent. The solubilized protein

concentration was estimated in the supernatant and in the resuspended pellets to calculate the yield of solubilization.

PROTEOLIPOSOME PREPARATION

Proteoliposomes were prepared with DPPC, DPPS and cholesterol at different weight ratios. The lipid mixture was dissolved in 1 ml chloroform and dried under nitrogen flow, and the lipid film formed was maintained under vacuum for 1 h. Then, 2 ml of a solution of 5 mM TRIS-HCl (pH 7.5) containing 25 mg/ml SDS was added to the film. The mixture was incubated at 60°C for 1 h and vortexed at 10-min intervals. After that, solubilized lipids were sonicated, using the microtip, for 2 min at 240 W. One milliliter of SDS-solubilized protein extract (0.5 mg/ml) was added to this mixture, which was then incubated for 45 min at room temperature. The detergent was removed from the mixture using 200 mg/ml Calbiosorb hydrophobic resin. After detergent removal, the mixture was centrifuged at $140,000 \times g$ for 1 h and the pellet, constituted by proteoliposomes, was resuspended in 1 ml of 5 mM TRIS-HCl. Liposomal formulations in the absence of protein were prepared with identical lipid composition and used as control.

ESTIMATION OF LIPID CONCENTRATION

The lipid constitution of proteoliposomes or liposomes was determined by thin-layer chromatography (TLC, silica plate) after extraction with chloroform:methanol (1:1 v/v) using as primary solvent chloroform:methanol:ammonia (65:35:5 v/v) and as secondary solvent chloroform:methanol:acetone:acetic acid:water (10:2:4:2:1 v/v) in the same dimension. After lipid detection, using iodine vapor, the silica spots were scraped and treated with chloroform and the phospholipids and cholesterol were quantified as described by Chen, Toribara & Warner (1956) and Higgins (1987), respectively.

ISOPYCNIC DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

A continuous sucrose gradient was prepared as described by Daghestanli et al. (2004) (1–30% sucrose in 5 mM TRIS-HCl [pH 7.5], density ranging 1.0381–1.1764) using a Gradient Maker (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco, CA). Samples of SDS-solubilized protein extract, liposomes or proteoliposomes (500 μ l) were loaded on the gradient and centrifuged at $180,000 \times g$ for 4 h at 25°C. The gradients were then fractionated into 500 μ l fractions and analyzed for protein and inorganic phosphate content (Chen et al., 1956).

LIGHT SCATTERING OF PROTEOLIPOSOMES

The liposome and/or proteoliposome size distribution was determined by dynamic light scattering using a Zetasizer 3000HS_A (Malvern Instruments, Malvern, UK). Proteoliposomes were stored at 4°C, and the diameter average was monitored for 15 days.

EVALUATION OF PROTECTION AGAINST INFECTION WITH *L. AMAZONENSIS*

Groups of five animals were immunized intraperitoneally (i.p.) with liposome, 20 μ g of SDS-solubilized protein extract or proteoliposome (10, 20 or 40 μ g). The control group received PBS. At 3 weeks after immunization, mice were challenged with one subcutaneous injection in the right hind footpad with 10^6 stationary growth phase *L. amazonensis* promastigotes. At various times after infection, footpads were measured with a caliper (125MEA-6/150; Starrett,

São Paulo Brazil). Lesion size was determined by subtracting the caliper-measured thickness of the uninfected contralateral footpad from that of the infected one.

Results

SOLUBILIZATION OF *L. AMAZONENSIS* MEMBRANE AND IDENTIFICATION OF ANTIGENIC PROTEINS

A typical preparation of crude extract of *L. amazonensis* by sonication yields around 44% of water-soluble proteins. By Western blotting, these proteins were shown to be reactive to an antiserum generated by inoculation of live promastigotes into mice (*data not shown*). To enhance the process of solubilization, frozen pellets of amastigotes were resuspended in TRIS buffer and sonicated, protein was quantified and detergent was added.

The capacity of the detergent to solubilize the crude extract was studied using different classes of surfactants in the concentration range of about 0.05–7.0% (w/v) and using different times and temperatures of incubation and different protein concentrations. The soluble protein recovery of crude extract of *L. amazonensis* (0.5 mg/ml) treated for 2 h at 25°C with 0.4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) CHAPSO, 1% (w/v) Tween 20 or 5% (w/v) Polidocanol were similar, yielding approximately 59% of the parasite proteins. Our results indicate that the most efficient detergent at solubilizing *L. amazonensis* membrane proteins was SDS at a concentration of 0.1% (w/v), giving a recovery of 93%.

To visualize the proteins present in the crude extract of *L. amazonensis* solubilized with the various detergents, a silver stain method was used. Our results, presented in Figure 1A, indicate that almost every preparation displayed a similar pattern of protein recovery. However, the SDS-solubilized protein extract, as expected from protein determination, gave higher yields (Fig. 1A, lane 5a). Consistent with this finding, the unsolubilized pellet displayed only discrete protein bands (Fig. 1A, lane 5b). The electrophoretic profile of supernatants and pellets was very similar when the solubilization of *L. amazonensis* membrane proteins was achieved with the other detergents (Fig. 1A, lanes 2, 3, 4, 6, a and b). Figure 1B shows the antigenic profiles of crude extract and SDS-solubilized protein extract after reaction with antiserum against total *L. amazonensis* antigenic determinants (lanes 8 and 9, respectively).

In order to determine the optimal conditions for efficient solubilization of proteins with SDS from the crude extract of *L. amazonensis*, the effects of this detergent dependent on protein concentration, incubation time and temperature were studied. Figure 2 shows the amount of protein solubilized as a function of SDS concentration for a fixed amount of protein in

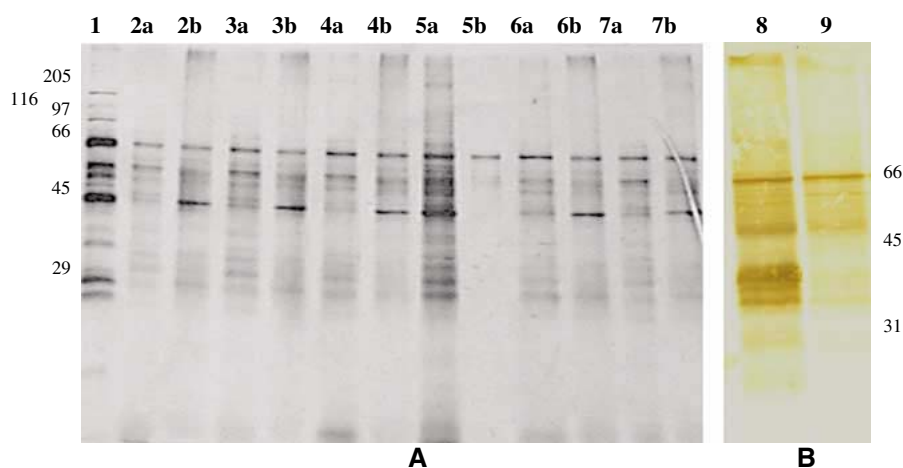


Fig. 1. (A) Silver-stained SDS-PAGE gel of proteins from *L. amazonensis*. Aliquots of 0.5 mg/ml of crude extract were mixed at 25°C with different detergents, as described in Materials and Methods. Supernatants containing solubilized proteins are shown in lanes labeled a and resuspended pellet in lanes labeled b. Lanes: 1, molecular mass standard proteins in kDa; 2, 0.4% (w/v) CHAPS; 3, 0.3% (w/v) CHAPSO; 4, 1% (w/v) Tween 20; 5, 0.1% (w/v) SDS; 6, 5% (w/v) Polidocanol and 7, without detergent (control). (B) Western blotting analysis of (lane 8) crude extract and (lane 9) SDS-solubilized protein extract with antisera prepared as described in Materials and Methods.

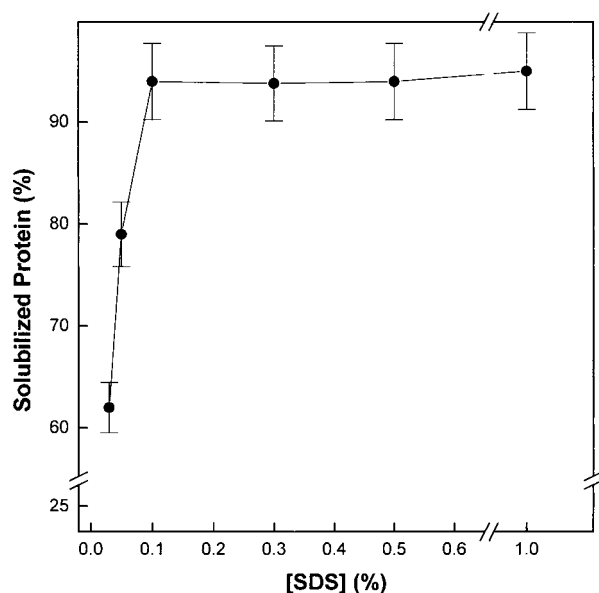


Fig. 2. Effect of SDS concentration on the solubilization of crude extract of *L. amazonensis*. Aliquots of 0.5 mg/ml of crude extract were mixed at 25°C with SDS at different concentrations. After 2 h, the solubilized proteins were separated by centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h.

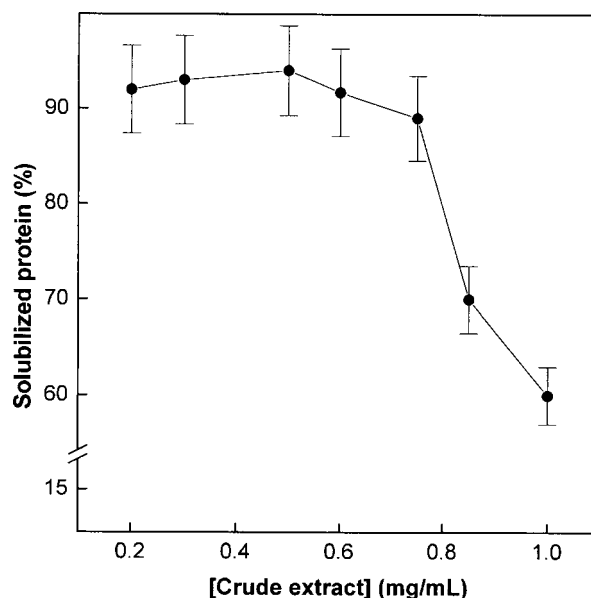


Fig. 3. Effect of protein concentration on the solubilization of crude extract of *L. amazonensis*. Different concentrations of crude extract were mixed at 25°C with 0.1% (w/v) SDS. After 2 h, the solubilized proteins were separated by centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h.

the extract. Under these conditions, the amount of solubilized proteins increased steadily, reaching a maximum at a detergent concentration of 0.1% (w/v). Higher concentrations of SDS did not increase the amount of proteins recovered in solution. Changes in protein concentration for the fixed SDS concentration of 0.1% (w/v) showed that 0.5 mg/ml of crude extract gave the maximum yield of 94% (Fig. 3). The degree of solubilization decreased as protein con-

centration increased above 0.5 mg/ml, suggesting that this amount of detergent was insufficient to promote solubilization of the larger quantities of membrane proteins. Accordingly, using a ratio of 0.5 mg/ml of protein to 0.1% (w/v) SDS at 4°C, the solubilization of crude extract was achieved almost instantaneously (*data not shown*).

It is important to remark that the SDS-solubilized protein extract of *L. amazonensis* contains little

phospholipid and sterol, resulting in 27 and 38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total protein, respectively, when determined after chloroform extraction.

PROTEOLIPOSOME PREPARATION AND CHARACTERIZATION

In order to prepare proteoliposomes, different mixtures of lipids (DPPC or DPPS alone or both phospholipids with or without cholesterol, in different proportions) and SDS-solubilized protein extract were used and optimization of protein incorporation was obtained using the mixtures of DPPC, DPPS and cholesterol at weight ratios of 5:1:4 and 0.5 mg/ml of protein. The incorporation of proteins into liposomes by the cosolubilization method requires complete removal of the detergent. Here, SDS removal was achieved by batch hydrophobic adsorption with the Calbisorb resin, giving an SDS-free proteoliposome. In our system, the reconstitution of solubilized proteins was around 60%.

To determine the stability of the proteoliposomes in TRIS buffer, a dynamic light scattering assay was used. This assay revealed that the average diameter of the proteoliposome was 140 nm soon after preparation and 150 nm after 15 days, indicating a high stability of this system.

Data presented in Table 1 indicate that lipid composition of liposome results in considerable loss of amount of DPPC and cholesterol, exhibiting a marked change of the initial lipid proportion present in solution. Also, during the formation of the proteoliposome a high loss of both phospholipids occurs compared with the concentration of remaining cholesterol. Probably, this process occurs to incorporate and stabilize the proteins in the vesicular system besides the loss by resin adsorption and/or the formation of liposomes free of protein.

To characterize the degree of incorporation of *L. amazonensis* proteins into proteoliposomes, an isopycnic density gradient centrifugation was performed, and the fractions were assayed for protein and phosphate contents. As shown in Figure 4A, analysis of SDS-solubilized protein extract revealed the presence of proteins in the middle region of the gradient (around 14.2–16.2% sucrose concentration, density 1.058–1.064 g/cm^3). With liposomes, a peak corresponding to the inorganic phosphate content occurred at 12% sucrose, density 1.046 g/cm^3 (Fig. 4B). Finally, proteoliposomes showed a single peak at 11.3% sucrose concentration (1.042 g/cm^3), for both the inorganic phosphate and protein, indicating efficient incorporation during reconstitution of SDS-solubilized protein extract (Fig. 4C).

SDS-PAGE of proteoliposomes revealed a variety of proteins with a distribution similar to that observed in the SDS-solubilized protein extract of *L. amazonensis*, indicating nonselective incorporation of parasite proteins into liposomes (Fig. 5A, lane 3).

Table 1. Lipid composition (in w/w and mol/mol proportion) of the liposome and proteoliposome determined by silica plate TLC as described in Materials and Methods

Sample	DPPC:DPPS: cholesterol (w/w) ratio	DPPC:DPPS: cholesterol (moles/moles) ratio
Initial mixture	5:1:4	5:1:7
Liposome	3:1:3	3:1:6
Proteoliposome	1:1:5	1:1:9

To determine whether BALB/c mice inoculated with proteoliposome were capable of producing antibodies against *L. amazonensis* proteins, five animals were inoculated with one i.p. injection of 20 μg of the material and, 3 weeks later, bled and their sera pooled. Our results of immunoblotting with SDS-solubilized protein extract, which had been electrophoretically separated by SDS-PAGE and probed with serum from mice inoculated with proteoliposome, indicate that these animals were able to produce antibodies against *L. amazonensis* proteins present in the SDS-solubilized protein extract reconstituted into DPPC:DPPS:cholesterol liposomes (Fig. 5B, lane 5).

To evaluate whether the proteoliposomes-carrying *L. amazonensis* antigens could induce an immune response in BALB/c mice to generate some degree of protective immunity to a homologous infection, mice were inoculated with different concentrations of the preparation (Table 2). Our results indicate that mice injected with proteoliposomes that contained parasite antigens were able to counteract the promastigote infection in a dose-response manner. Mice inoculated with 10–40 μg of proteoliposome presented a significant reduction in the size of the footpad lesion at 12 weeks of infection, with less skin damage at higher concentration of antigen (Table 2).

Discussion

Liposomes have been used in experimental therapeutics as carriers for drugs (Pinto-Alphandary, Andremont & Couvreur, 2000) or as immunoadjuvants for vaccine preparations (Gregoriadis, 1990). To achieve these goals, proteoliposome systems can be prepared by a variety of techniques, such as mechanical dispersion, sonication, extrusion, solvent dispersion, reverse phase evaporation and cosolubilization with detergents (Camolezi et al., 2002). As a preliminary stage to investigate the possibility of using liposomes to induce protective immunity in mice to homologous infection, we incorporated SDS-solubilized protein extract of *L. amazonensis* into negatively charged liposomes.

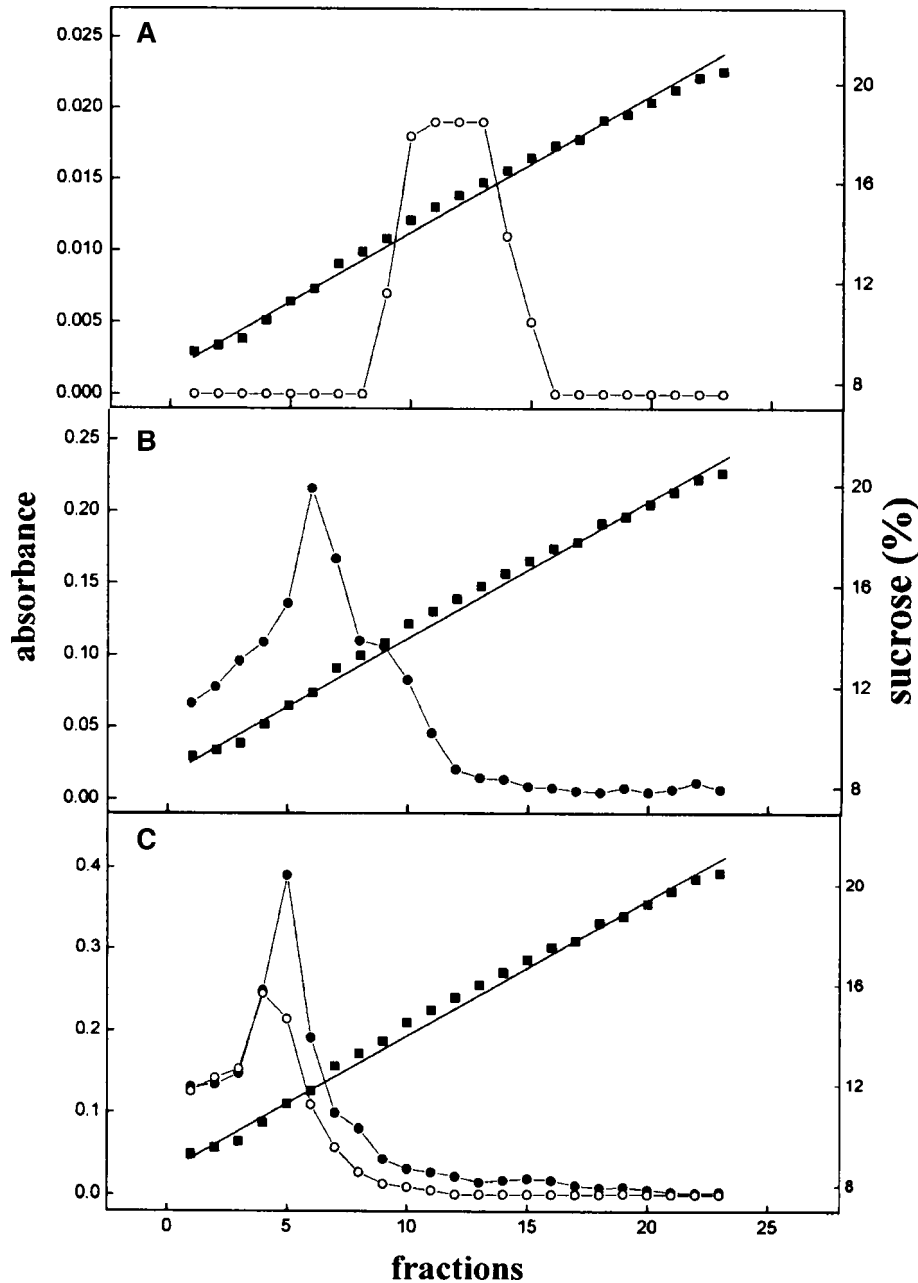


Fig. 4. Isopycnic density sucrose gradient centrifugation study. (A) SDS-solubilized protein extract of *L. amazonensis*. (B) Liposome. (C) Proteoliposome. ○, Protein, absorbance at 595 nm; ●, lipid, absorbance at 820 nm; and ■, percent sucrose.

Negatively charged liposomes have been shown to be efficient vehicles for specific delivery of anti-*Leishmania* drugs to mouse macrophages (Tempone et al., 2004). Accordingly, we prepared proteoliposomes with DPPC, DPPS and cholesterol, as a way to present *Leishmania* antigens to scavenger receptors, which are present in macrophages and dendritic cells (Harshyne et al., 2003; Shakushiro et al., 2004; Greaves & Gordon, 2005).

In view of the important role played by the cell-surface molecules of pathogenic protozoa in their interaction with the host, some effort has been devoted to the characterization of these membrane components. Because the components of *L. amazon-*

ensis membrane appear to be associated with its pathogenic activity, it has been suggested that generating an immune response against these components could lead to the development of immunoprophylaxis against cutaneous leishmaniasis (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Two major surface molecules, lipophosphoglycan and the zinc-metalloproteinase gp63, have been studied (Descoteaux & Turco, 1999; Ilgoutz & McConville, 2001).

We chose amastigotes of *L. amazonensis* as the source for antigen because developmentally regulated molecules may be biologically important for the intracellular survival of the parasite. Furthermore, the amastigote is the stage of *Leishmania* parasites

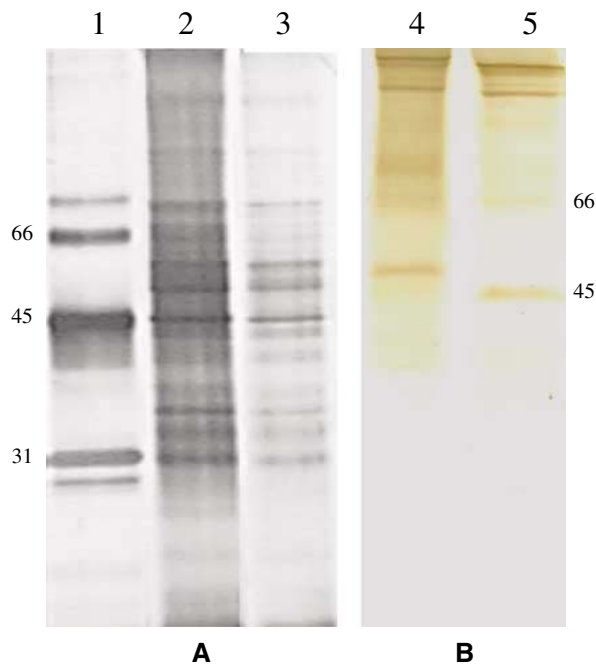


Fig. 5. (A) Silver-stained SDS-PAGE gel of proteins from *L. amazonensis*. Lane 1, molecular mass standard proteins in kilodaltons; lane 2, SDS-solubilized protein extract; and lane 3, proteins present in proteoliposomes. (B) Western blotting analysis of SDS-solubilized protein extract with: lane 4 antiserum prepared as described in Materials and Methods and (lane 5) sera collected 3 weeks after immunization intraperitoneal from mice with 20 µg of proteoliposome.

responsible for the pathology associated with this disease, and antigens from the amastigote have been previously used in the construction of a leishmanial vaccine by others (Rafati et al., 2000; Aebischer et al., 2000). Furthermore, the efficacy of immunization of BALB/c mice with purified soluble amastigote proteins has been reported for three amastigote antigens (P-2, P-4 and P-8), which provided significant protection against infection with *L. pifanoi* (Soong et al., 1995).

A successful strategy for membrane reconstitution involves three main aspects: (1) partial or complete solubilization of the membrane protein and lipid components, (2) preservation of the biological activity of the solubilized proteins and (3) mixing of the solubilized purified protein and lipids in order to achieve reconstitution (Silvius, 1992). To be amenable to being incorporated into liposomes, the membrane protein components must first be solubilized. Many detergents have been used to obtain solubilized proteins from membranes, namely sodium deoxycholate, SDS, sodium cholate, Empingem BB and octylglucopyranoside (Parmar, Edwards & Madden, 1999; Daghestanli et al., 2004). The process of membrane protein solubilization is affected by both the ionic character and the critical micellar concen-

Table 2. Level of protection against *L. amazonensis* promastigotes of BALB/c mice immunized with different concentrations of proteoliposome

Immunized Group ^a	Lesion size	
	(mm) ^b	(%) Reduction
PBS	7.9 ± 1.1	–
Liposome	6.5 ± 0.7	18
SDS-solubilized protein extract (20 µg)	7.9 ± 0.7	0
Proteoliposome (10 µg)	5.9 ± 0.5	25
Proteoliposome (20 µg)	5.1 ± 0.2	35
Proteoliposome (40 µg)	4.1 ± 0.5	48

^a BALB/c mice were immunized i.p. with liposome, SDS-solubilized protein extract or proteoliposome as described in Materials and Methods. Mice given PBS were used as control. At 3 weeks after immunization, all animals were challenged with 10⁶ *L. amazonensis* promastigotes.

^b Lesion size represents the mean lesion diameter in mm ± SE of lesions developing in groups of five animals at 12 weeks postinfection.

tration of the detergent (Santos & Ciancaglini, 2000). The solubilization of membrane proteins of *L. amazonensis* with neutral and zwitterionic detergents was shown to be less efficient than with the anionic detergent SDS (Fig. 1A, lane 5a). Although SDS is known as a denaturing detergent, in our hands it showed higher solubilization capacity (94%) without a significant loss of antibody-binding ability of the solubilized material (Fig. 1B, lane 9).

Antigenic proteins present in the SDS-solubilized protein extract were used to prepare proteoliposomes by a cosolubilization method in which detergent, lipid and protein were mixed. A critical factor in this technique is complete removal of the detergent (Rigaud et al., 1998, Daghestanli et al., 2004). Among the usual methods for detergent removal, the hydrophobic resin is preferable because it is very rapid and does not dilute the sample (Haaker & Racker, 1979; Furth et al., 1984; Jones et al., 1988; Silvius, 1992; Rigaud et al., 1998). Using the Calbisorb resin, as described by Daghestanli et al. (2004), SDS removal can be as high as 99%. In our hands, the use of Calbisorb resin for detergent removal allowed 60% incorporation of SDS-solubilized protein extract into proteoliposomes.

Our results with sucrose density gradients to characterize the protein incorporation in the lipid bilayer of lamellar liposomes indicate that liposomes reconstituted with DPPC, DPPS and cholesterol present a wide peak of phosphate originated from acid hydrolysis of phospholipids, indicating the presence of different liposome populations distributed in two close density ranges (Fig. 4B). Proteoliposomes showed a single symmetric elution profile, as detected by phosphate and protein estimation, indicating a remarkably homogeneous distribution of

the vesicle population and the consistent absence of other lipid-protein aggregates (Fig. 4C). Furthermore, these systems appear in lower densities probably because of their cholesterol content, as shown in Table 1 and described by other authors (Cevc & March, 1987). Our results clearly indicate that the method employed here may lead to efficient protein reconstitution, reaching a yield of 60% in a homogeneous proteoliposome population having a similar density to that of the single lipid vesicle.

Incorporation of the protein into vesicles depends on many factors but mainly on the length of the fatty acid hydrocarbon chains and the type of polar head group of phospholipid component in the liposomes, as recently shown for antigenic membrane proteins of *Pasteurella multocida* (Daghastanli et al., 2004). Our results indicate that *L. amazonensis* membrane proteins are efficiently incorporated in proteoliposomes containing palmitoyl acyl chain, present also in phosphatidylcholine and phosphatidylserine phospholipids.

The liposome bilayer composition has an important effect on its interaction with tissues and might be critical for targeting to specific antigen-processing cells. Anionic liposomes containing phosphatidylcholine, cholesterol and phosphatidylglycerol or phosphatidylserine interact with a small percentage of human and murine dendritic cells (Foged et al., 2004). In contrast, inclusion of mannosylated phosphatidylethanolamine in the design of cationic liposomes, intended for targeting the mannose receptor, increases the interaction of these vesicles with dendritic cells. Also, cationic liposomes interact with a very high percentage of both human and murine dendritic cells (Foged et al., 2004).

Membrane antigens of *L. donovani* promastigotes, when entrapped in liposomes, can induce very significant levels of protection against infection in both hamsters and BALB/c mice (Afrin & Ali, 1997; Ali & Afrin, 1997; Afrin, Anam & Ali, 2000). In mice, the extent of protection conferred by these antigens varies depending on the overall surface charge of the proteoliposome. It has been shown that liposomes containing phosphatidylserine entrapped with pentavalent antimony are taken up by macrophages via scavenger receptors, these systems being 16-fold more effective against *L. chagasi*-infected macrophages than the free drug (Tempone et al., 2004).

This report presents the biophysical characteristics of the proteoliposomes and a preliminary study of humoral immunological reactivity and protective immunity of BALB/c mice immunized with these proteoliposomes. We have shown that a careful choice of the mixture DPPC, DPPS and cholesterol used to obtain proteoliposomes was essential to optimize protein incorporation. Furthermore, these studies resulted in a proteoliposome constituted by multiple *L. amazonensis* proteins, which not only were recog-

nized by the antiserum against total *L. amazonensis* antigenic determinants but also generated considerable level of protective immunity in mice (Table 2). Accordingly, we are confident in suggesting that this proteoliposome system could be used as a carrier for antigenic proteins from *L. amazonensis*, thus contributing to the development of potential vaccine candidates for cutaneous leishmaniasis prevention.

The authors thank Ms. Priscila Cerviglieri for revision of the text manuscript. F. J. R. P. is an emeritus researcher of CNPq. We also thank FAPESP, CNPq and CAPES for the financial support given. F. R. S. and K. R. P. D. are recipients of a studentship from CAPES and FAPESP, respectively.

References

- Aebischer, T., Wolfram, M., Patzer, S.I., Ilg, T., Wiese, M., Overath, P. 2000. Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infect. Immun.* **68**:1328–1336
- Afrin, F., Ali, N. 1997. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect. Immun.* **65**:2371–2377
- Afrin, F., Anam, K., Ali, N. 2000. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *J. Parasitol.* **86**:730–735
- Afrin, F., Rajesh, R., Anam, K., Gopinath, M., Pal, S., Ali, N. 2002. Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **70**:6697–6706
- Ali, N., Afrin, F. 1997. Protection of mice against visceral leishmaniasis by immunization with promastigote antigen incorporated in liposomes. *J. Parasitol.* **83**:70–75
- Camolezi, F.L., Daghastanli, K.R.P., Magalhães, P.P., Pizauro, J.M., Ciancaglini, P. 2002. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**:1091–1101
- Cevc, G., March, D. 1987. Bilayer elasticity. In: E. E. Bittar editor. *Phospholipid Bilayers, Physical Principles and Models*. Cell Biology: A Series of Monographs, pp 347–368. Wiley, New York
- Chen, P.S. Jr., Toribara, T.Y., Warner, H. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**:1756–1758
- Courret, N., Frehel, C., Prina, E., Lang, T., Antoine, J.C. 2001. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology* **122**:263–279
- Daghastanli, K.R.P., Ferreira, R.B., Thedei, G. Jr., Maggio, B., Ciancaglini, P. 2004. Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **36**:127–137
- de Jonge, M.I., Hamstra, H.J., Jiskoot, W., Roholl, P., Williams, N.A., Dankert, J., van Alphen, L. van, van der Ley, P. van der 2004. Intranasal immunisation of mice with liposomes containing recombinant meningococcal OpaB and OpaJ proteins. *Vaccine* **22**:4021–4028
- Descoteaux, A., Turco, S.J. 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**:341–352
- Foged, C., Arigita, C., Sundblad, A., Jiskoot, W., Storm, G., Frokjaer, S. 2004. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* **22**:1903–1913

- Furth, A.J., Bolton, H., Potter, J., Priddle, J.D. 1984. Separating detergent from proteins. *Methods Enzymol.* **104**:318–328
- Greaves, D.R., Gordon, S. 2005. Thematic review series. The immune system and atherogenesis: recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J. Lipid Res.* **46**:11–20
- Gregoriadis, G. 1990. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today* **11**:89–97
- Haaker, H., Racker, E. 1979. Purification and reconstitution of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membrane of pig erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **254**:6598–6602
- Harshyne, L.A., Zimmer, M.I., Watkins, S.C., Barrat-Boyes, S.M. 2003. A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J. Immunol.* **170**:2302–2309
- Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**:422–427
- Hespanhol, R.C., de Nazaré, C., Soeiro, M., Meuser, M.B., de Nazareth, S.L., Meirelles, M., Corte-Real, S. 2005. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J. Histochem. Cytochem.* **53**:35–44
- Higgins, G. 1987. Separation and analysis of membrane lipid components. In: J. B. C. Findlay, W. H. Evans, editors. *Biological Membranes. Practical Approach Series*, pp 104–137. IRL Press, Oxford
- Ilgoutz, S.C., McConville, M.J. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int. J. Parasitol.* **31**:899–908
- Jones, O.T., Eubanks, J.H., Earnest, J.P., McNamee, M.G. 1988. Reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor using a lipid substitution technique. *Biochim. Biophys. Acta* **944**:359–366
- Kita, Y., Tanaka, T., Yoshida, S., Ohara, N., Kaneda, Y., Kuwayama, S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Hashimoto, S., Takai, H., Okada, C., Fukunaga, Y., Sakaguchi, Y., Furukawa, I., Yamada, K., Inoue, Y., Takemoto, Y., Naito, M., Yamada, T., Matsumoto, M., McMurray, D.N., Cruz, E.C., Tan, E.V., Abalos, R.M., Burgos, J.A., Gelber, R., Skeiky, Y., Reed, S., Sakatani, M., Okada, M. 2005. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* **23**:2132–2135
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685
- le Maire, M., Champeil, P., Moller, J.V. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**:86–111
- Lezama-Davila, C.M. 1997. Vaccination of different strains of mice against cutaneous leishmaniasis: usefulness of membrane antigens encapsulated into liposomes by intraperitoneal and subcutaneous administration. *Arch. Med. Res.* **28**:47–53
- Mazumdar, T., Anam, K., Ali, N. 2004. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine* **22**:1162–1171
- Mitchell, G.H., Thomas, A.W., Margos, G., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* **72**:154–158
- Noronha, F.S., Nunes, A.C., Souza, K.T., Melo, M.N., Ramalho-Pinto, F.J. 1998. Differential sensitivity of new world *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. *Acta Trop.* **69**:17–29
- Nunes, A.C., Almeida-Campos, F.R., Horta, M.F., Ramalho-Pinto, F.J. 1997. *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the steps of the cascade. *Parasitology* **115**:601–609
- Parmar, M.M., Edwards, K., Madden, T.D. 1999. Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta* **1421**:77–90
- Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**:155–168
- Rafati, S., Baba, A.A., Bakhshayesh, M., Vafa, M. 2000. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin. Exp. Immunol.* **120**:134–138
- Read, S.M., Northcote, D.H. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**:53–64
- Rigaud, J.L. 2002. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**:753–766
- Rigaud, J.L., Lévy, D., Mosser, G., Lambert, O. 1998. Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *Eur. Biophys. J.* **27**:305–319
- Sacks, D., Noben-Trauth, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:845–858
- Santos, H.L., Ciancaglini, P. 2000. A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions for solubilizing a membrane protein. *Biochem. Educ.* **28**:178–182
- Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**:105–117
- Shakushiro, K., Yamasaki, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y. 2004. Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells. *Immunology* **112**:211–218
- Silvius, J.R. 1992. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**:323–348
- Soong, L., Duboise, S.M., Kima, P., McMahon-Pratt, D. 1995. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **63**:3559–3566
- Tempone, A.G., Perez, D., Rath, S., Vilarinho, A.L., Mortara, R.A., de Andrade, H.F. Jr. 2004. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:60–68
- Uemura, A., Watarai, S., Ohnishi, Y., Kodama, H. 2005. Protective effect of antiganglioside antibodies against experimental *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Parasitol.* **91**:73–78

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](#)