

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Caracterização da resposta imune induzida por protocolos de
vacinação dose e reforço usando diferentes vetores virais
(Adenovírus e MVA) expressando o gene A2 de *Leishmania
donovani***

por

Míriam Santos Dutra

Belo Horizonte
Janeiro/2008

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

“Caracterização da resposta imune induzida por protocolos de vacinação dose e reforço usando diferentes vetores virais (Adenovírus e MVA) expressando o gene *A2 de Leishmania donovani*”

por

Míriam Santos Dutra

Dissertação apresentada com vistas à obtenção de Título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Ricardo Tostes Gazzinelli.

Co-Orientação: Ana Paula Salles Fernandes e Flávio Fonseca Guimarães.

Belo Horizonte

Janeiro/2008

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

“Caracterização da resposta imune induzida por protocolos de vacinação dose e reforço usando diferentes vetores virais (Adenovírus e MVA) expressando o gene *A2 de Leishmania donovani*”

por

Míriam Santos Dutra

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes (Presidente)

Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado

Profa. Dra. Leda Quércia Vieira

Suplente: Profa. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Dissertação ou tese defendida e aprovada em: 07/01/08

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Ricardo Gazzinelli, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, onde tive ampla condição de realizar esse trabalho.

Agradecimento especial à professora, co-orientadora e amiga Ana Paula, pela orientação, amizade, total dedicação e disponibilidade em todos os momentos em que precisei, por meu ouvir e me aconselhar nos momentos difíceis.

Ao meu co-orientador, Flávio pela orientação e ajuda em vários momentos, principalmente nos que precisei de uma mão extra na bancada.

Agradeço imensamente aos colegas de trabalho em especial à Dani, que esteve comigo desde o início desse projeto.

Aos amigos da Biologia pela amizade de cada um, por compartilharem as minhas dúvidas e pelos conselhos sempre bem vindos.

Ao meu marido, pais e irmãos, pela compreensão e amizade durante todos esses anos.

A todos, meu muito obrigada!

Agradecimentos

Aos órgãos financiadores: FIOCRUZ, CNPq e Instituto do Milênio de Tecnologia e Desenvolvimento de Vacinas (IMTEV) – nº processo: 420067/2005-1.

SUMÁRIO

Lista de Figuras:.....	8
Lista de Tabelas:	9
Lista de Abreviaturas.....	10
Resumo	11
Abstract	12
1 Introdução:	13
2 Justificativa:.....	25
3 Objetivos do Projeto:.....	26
4 Metodologia:.....	27
4.1 Linhagens celulares:	27
4.2 Plasmídeos utilizados para geração do MVA-A2 e vacinação dos animais:	27
4.3 Construção do plasmídeo recombinante:.....	29
4.4 Produção e triagem do MVA-A2:	31
4.5 Purificação e titulação do MVA-A2:.....	31
4.6 Análise da expressão da proteína A2 pelos MVA-A2:.....	32
4.7 Animais:	33
4.8 Preparação dos antígenos de <i>L. chagasi</i> :.....	33
4.9 Protocolos de imunização:	34
4.9.1 Análise comparativa das vias de imunização:	34
4.9.2 Vacinação dos animais:	35
4.10 Avaliação da Resposta imune humoral e celular:	36
4.10.1 Resposta Humoral:	36
4.10.2 Resposta celular:	37
4.10.3 Citotoxicidade in vivo:	38
4.11 Análise estatística:	39
5 Resultados:	41
5.1 Obtenção do MVA-A2:	41
5.2 Análise da expressão da proteína A2 pelo MVA-A2:	45
5.3 Análise comparativa das vias de imunização:.....	47
5.4 Avaliação da resposta imune celular:.....	49

5.5	Avaliação da resposta imune humoral:	53
6	Discussão:.....	57
7	Conclusões e Perspectivas do trabalho:	68
8	Referências Bibliográficas:.....	69

Lista de Figuras:

Figura 1: Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína A2 de <i>L. donovani</i> e <i>L. chagasi</i>	19
Figura 2: Seqüência do fragmento de DNA codificador da proteína A2	28
Figura 3: Esquema representativo do pLW44	30
Figura 4: Clonagem do gene A2 no vetor pLW44	42
Figura 5: Análise de expressão da proteína A2.....	44
Figura 6: Geração do MVA recombinante contendo o gene A2 de <i>Leishmania</i>	46
Figura 7: Citotoxicidade in vivo induzida pela vacinação com MVAA2 por diferentes vias de imunização	48
Figura 8: ELISPOT após dose de reforço	50
Figura 9: Citotoxicidade após a dose de reforço	52
Figura 10: ELISA de soros de animais vacinados contra SLA de promastigota.....	54
Figura 11: ELISA de soro de animais vacinados contra SLA de amastigota.....	56

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Análise comparativa das vias de imunização	35
Tabela 2: Grupos de vacinação dose-reforço heterólogo.....	36

Lista de Abreviaturas

A2: Antígeno 2
AdA2: Adenovírus A2
ASP: Proteína de Superfície de Amastigota (Amastigote Surface Protein)
CEF: Fibroblastos de Embrião de Galinha (Chicken Embryo Fibroblasts)
CFSE: Carboxi Fluorosceína Succinimidil Éster
CTL: Lintófito T Citotóxico (Citotoxic T Lymphocyte)
ConA: Concanavalina A
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
DMEM: Meio Eagle modificado por Dubelcco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISPOT: Enzyme-linked immunosorbent spot
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fab: Fragmento ligante de antígeno (Fragmento antigen binding)
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
FML: Fucose-Manose Ligante
IFN γ : Interferon gama
IL2r: Interleucina 2 recombinante
IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
MVA: Vaccinia Ankara Virus Modificado (Modified Vírus Ankara)
MOI: Multiplicidade de Infecção (Multiplicity of Infection)
PBS: Solução Fosfato Salina (Phosphate Saline Buffer)
SLA: Antígeno Solúvel de Leishmania (Soluble Leishmania Antigen)
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RPM: Rotações por Minuto.
SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Resumo

As Leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde como uma das seis doenças tropicais mais importantes. A ausência de uma forma eficaz de controle e contenção da doença justifica o desenvolvimento de uma vacina mais eficaz. Por sua vez, o antígeno A2, exclusivamente expresso nas formas amastigotas de *Leishmania* tem sido considerado um excelente alvo no desenvolvimento de formulações vacinais em fase experimental. Esse trabalho visou à caracterização da resposta imune induzida por diferentes protocolos de vacinação dose e reforço usando, além do MVA-A2, o Adenovírus-A2, AdA2. O MVA é um vírus atenuado, derivado do Vírus Vaccínia Ankara, não replicativo em células de mamíferos. Assim, foram avaliadas as respostas celular, por ensaios de ELISPOT e citotoxicidade *in vivo*, mediante estimulação dos esplenócitos com peptídeos correspondentes aos epítomos para células TCD4⁺ e TCD8⁺ na proteína A2 e a resposta humoral, por ELISA. Apenas os animais vacinados com AdA2 + MVAA2 apresentaram níveis elevados de células produtoras de IFN γ e níveis de baixos IL-10 e IL-4, sob estimulação com ambos os peptídeos, nos ensaios de ELISPOT. Da mesma forma, alta porcentagem de lise foi observada apenas nesse grupo de animais, indicando que esse esquema vacinal foi capaz de induzir a resposta de células T CD8⁺ e TCD4⁺. A resposta imune induzida nesse grupo, considerada do tipo Th1, tem sido relacionada à proteção contra a infecção desafio por diferentes espécies de *Leishmania*. Nos testes de ELISA, não foi identificada produção de anticorpos contra o Antígeno Solúvel de *Leishmania*, SLA, da forma promastigota, em quaisquer grupos vacinais, o que os diferenciou dos animais infectados, nos quais a produção foi observada. Isso é importante no diagnóstico dos cães domésticos, uma vez que a vacina atual não possibilita essa diferenciação. Nos outros grupos vacinados, a resposta imune celular será investigada contra a forma íntegra da proteína A2 e SLA da forma amastigota.

Abstract

Leishmaniasis are being considered by the World Health Organization as one of the six most important tropical diseases. They are caused by several species of the genus *Leishmania*. The lack of an effective way to control and containment of the disease justifies the development of a more effective vaccine formulation. Thus, A2 antigen, exclusively expressed in the amastigote form of *Leishmania* has been considered an excellent target for a vaccine development in the experimental stage. Thus, this work aimed the characterization of the immune response induced by different prime-boost vaccination protocols applying, in addition to MVA-A2, Adenovirus-A2, AdA2. MVA is a virus derived from the Vaccinia Virus Ankara and has been attenuated in chicken embryo fibroblasts. The humoral immune response was evaluated by ELISA and cellular response, by ELISPOT and in vivo cytotoxicity. Splenocytes were stimulated with peptides corresponding to CD8⁺ and CD4⁺ T cell epitopes of A2 protein. As results, only animals vaccinated with AdA2 + MVAA2 showed high levels of IFN γ producing cells as well as low levels of IL-10 and IL-4, when stimulated with both peptides, in ELISPOT assays. Similarly, high percentage of lysis was observed exclusively in this group, indicating that this immunization protocol was able to induce both CD8⁺ T and CD4⁺ T cellular response. The induced cellular immune response, considered being type Th1, has been correlated to protection against challenge infection in many other studies. Anti A2-antibody production was not detected in sera of vaccinated animals, against promastigote Soluble *Leishmania* Antigen, SLA, which differentiated them from infected animals, in which this production was observed. It is especially important considering Leishmaniasis diagnostic in domestic dogs, once the current vaccine does not allow such differentiation. In other vaccinated groups, cellular immune response will be investigated against whole A2 protein and amastigote SLA.

1 Introdução:

As Leishmanioses são causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e podem apresentar diferentes formas clínicas. Estas formas constituem graves problemas de saúde pública, sendo consideradas pela Organização Mundial de Saúde como uma das seis doenças tropicais mais importantes de países em desenvolvimento (WHO, 2007). A incidência anual das leishmanioses é de aproximadamente 2 milhões de casos, sendo que destes, 500 mil correspondem a casos de leishmaniose visceral [1]. Cerca de 90% destes casos se concentram em apenas 5 países: Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão [2].

A forma mucocutânea da leishmaniose (LMC) é caracterizada por graves mutilações faciais, que ocorrem principalmente nas regiões nasal e oral. Na leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) os pacientes apresentam lesões não ulceradas distribuídas por todo o corpo. Já a forma cutânea (LC) é considerada mais branda, responsável por causar lesões nos locais de inoculação do parasita pelo vetor, mas também pode evoluir para uma forma mais grave, incapacitante [3].

A forma visceral da Leishmaniose (LV) é considerada a mais grave, podendo causar febre crônica, hepatosplenomegalia, pancitopenia, anemia e caquexia profunda. Cerca de 90% dos casos não tratados evoluem a óbito [4]. Contudo, os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos, embora aproximadamente 20% dos indivíduos em regiões endêmicas desenvolvam a forma clássica da doença [5].

As diversas formas da doença são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. Sabe-se também que vários genes do hospedeiro podem influenciar a forma e a gravidade da doença [6]. A leishmaniose visceral é causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani*, cada espécie apresenta uma distribuição geográfica própria, sendo *L. donovani* encontrada no sub-continente indiano, *L. infantum* se distribui pelo sul da Europa e *L. chagasi* (*L. infantum chagasi*) encontra-se presente nas Américas Central e Sul [7].

O ciclo de transmissão da doença se inicia quando fêmeas infectadas de flebotomídeos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, realizam o repasto sangüíneo no hospedeiro mamífero. Enquanto se alimentam, as fêmeas inoculam as formas

promastigotas metacíclicas, as quais são fagocitadas por macrófagos teciduais do hospedeiro (WHO, 2004). Ainda dentro dessas células, as Leishmanias conseguem evadir da destruição intracelular nos lisossomos, o que resulta em sua sobrevivência e sua posterior transformação na forma amastigota. Essa forma é então capaz de se reproduzir assexuadamente, até que o macrófago se rompa, liberando-as no tecido. As formas liberadas podem ser opsonizadas por anticorpos do hospedeiro, retornando aos macrófagos através do reconhecimento da porção Fc das imunoglobulinas por receptores celulares. Em um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere macrófagos infectados com amastigotas, que, no intestino do inseto, transformar-se-ão novamente em formas infectantes, promastigotas metacíclicas, completando o ciclo de vida do parasita [8].

No Brasil, o cão doméstico é considerado o principal reservatório de *L. chagasi*, devido ao fato de apresentar alta suscetibilidade à infecção e relação próxima com o homem, tanto em áreas urbanas, como rurais. Assim, a presença de cães soro positivos em residências é vista como um fator de risco à infecção por *L. chagasi*. Animais silvestres, como raposas do mato, gambás e roedores, também são considerados reservatórios importantes da leishmaniose visceral [9].

Na ausência de uma vacina com eficácia comprovada para evitar a transmissão do parasita e/ou a evolução e progressão da doença, o controle da leishmaniose se faz através da identificação e eliminação dos reservatórios da doença (cães infectados), controle das populações de vetor (principalmente *Lutzomyia longipalpis*), quando possível, e diagnóstico e tratamento dos casos humanos [10].

O diagnóstico mais comum da Leishmaniose visceral se faz através dos testes sorológicos e parasitológicos em aspirados de baço, medula óssea (mais comum em nosso país) e linfonodos (WHO, 2007). Os fármacos comumente utilizados no tratamento da doença são os antimoniais pentavalentes e, em casos de contra indicação destes, anfotericina B. Esses medicamentos são cardíaco, hepato, ou mesmo nefrotóxicos, podendo causar uma série de efeitos colaterais adversos e incômodos, como dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia [2]. Devido ao caráter zoonótico da doença, o diagnóstico e tratamento de pacientes têm pouco impacto sobre o controle da doença em nosso meio [3].

Uma vez que existem reservatórios domésticos e silvestres de difícil eliminação, torna-se praticamente impossível a erradicação da doença o que justifica o

desenvolvimento de medidas para o controle e contenção da doença, como o desenvolvimento de vacinas. Para tanto, vários grupos de pesquisa em todo o mundo têm se empenhado em desenvolver formulações vacinais seguras e eficazes que sejam capazes de impedir a infecção do flebotomíneo vetor, dessa forma, bloqueando o ciclo de vida da *Leishmania*. Muitas das preparações vacinais desenvolvidas e testadas experimentalmente contra a leishmaniose visceral utilizam formas atenuadas dos parasitas, subunidades protéicas definidas, proteínas recombinantes, ou extratos totais [11]. Vacinas de DNA codificando vários antígenos de *Leishmania* e vírus recombinantes também resultaram em proteção contra leishmaniose visceral em modelos experimentais [12].

Vários modelos animais podem ser usados para o estudo das diferentes formas de leishmaniose e avaliação de preparações vacinais. A infecção por *L. major* e a resposta imune relacionada ao desenvolvimento de resistência ou susceptibilidade em camundongos BALB/c é um dos modelos de leishmaniose cutânea mais bem estudados. Nele, observa-se uma clara dicotomia da resposta celular, em que a resposta Th1, com produção de citocinas como IL12, TNF α e IFN γ , levam à proteção e a resposta Th2, com produção de citocinas IL-4 e IL-10, levam ao desenvolvimento de lesões. Contudo, apesar de estabelecido que a resposta celular do tipo Th1 seja responsável pela proteção dos animais e que a constituição de forte resposta humoral, na ausência de resposta celular, sejam responsáveis pelo desenvolvimento da doença, nas leishmanioses viscerais, o papel das citocinas e das células T CD8⁺ ainda não estão totalmente esclarecidos [13].

A linhagem de camundongos BALB/c constitui um bom modelo para o estudo da leishmaniose visceral assintomática causada por *L. chagasi*, uma vez que são animais susceptíveis à infecção pelo parasita, mas não apresentam sintomas da doença [14]. Quando camundongos BALB/c são infectados por espécies de *Leishmania* causadoras da forma visceral, como *L. chagasi*, o fígado é o primeiro órgão de multiplicação do parasita, onde, na quarta semana de infecção, a proliferação atinge níveis máximos. Muitas vezes, os animais conseguem resolver completamente a infecção no fígado, após um determinado período de tempo. No baço e medula óssea, também ocorre proliferação dos parasitas, contudo, a menor taxa, nesses órgãos reservatórios os parasitas conseguem permanecer, muitas vezes, por toda a vida do animal [15].

O controle da infecção no fígado parece se dar a partir da formação de granulomas e eliminação dos parasitas por macrófagos ativados [16]. A expressão de citocinas Th1, como IL-12 por células apresentadoras de antígeno e IFN γ por células NK, TCD4⁺ e TCD8⁺ que induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase e produção de óxido nítrico pelos macrófagos, é importante, pois leva à progressiva regressão dos níveis de parasitas e controle da doença no decorrer de oito semanas [17]. A formação de granulomas no fígado e a atividade leishmanicida dos macrófagos ativados parecem ser, portanto, reguladas por mecanismos dependentes de IFN γ e nesses casos, IL-12 atua como estímulo primário à produção deste e, conseqüentemente, regularia os processos nos quais IFN γ participa para levar ao controle da infecção [18].

Murray e colaboradores realizaram, em 2000, um estudo utilizando animais nocautes para TNF α , e demonstraram que, após duas semanas da infecção por *L. donovani*, esses animais apresentavam cerca de 3 vezes mais parasitas no fígado, porém a formação de granulomas era semelhante, em comparação aos camundongos controle. Após quatro semanas de infecção, os animais nocautes apresentavam resposta inflamatória local exagerada, o que levou à necrose hepática disseminada e morte de 50% dos animais, após 6 semanas de infecção. Esses resultados sugerem a participação de TNF α no controle da infecção e sobrevivência dos animais infectados por *L. donovani* [19].

As primeiras quatro semanas de infecção no fígado são similares em camundongos C57BL/6 e nocautes para IL12 p-40, sugerindo que a resposta imune mediada por IL-12 não tem influência na progressão da doença até momentos tardios [20]. Contrariamente, no baço, onde os parasitas são capazes de permanecer por longos períodos, até mesmo durante toda a vida do hospedeiro, citocinas do tipo Th1, como IFN γ são produzidas mesmo nos momentos de maior parasitemia em animais infectados por *L. chagasi* [21].

Estudos com camundongos nocautes para IL-4 são controversos em demonstrar a influência desta citocina no desenvolvimento da forma crônica da leishmaniose visceral [13]. Nos casos em que IL-4 estimula o desenvolvimento da forma visceral, foi mostrado que IL-4 não apenas inibe a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, e a expressão de IL-12R β 2 como também regula negativamente a produção e atividade de IFN γ [22, 23].

Em 2001, Murphy e colaboradores realizaram estudo em que se demonstrou que camundongos BALB/c, nocautes para o gene de IL-10, tornavam-se resistentes à infecção por *L. donovani* e produziram mais IL-12 e IFN γ quando comparados aos camundongos normais, inicialmente suscetíveis à infecção [24]. Além disso, em 2002, Murray demonstrou que camundongos BALB/c transgênicos, capazes de expressar altas concentrações de IL-10 apresentavam cerca de 3 vezes mais parasitas no fígado que os animais controle, e, mesmo após 8 semanas de infecção, esses animais ainda apresentavam altos níveis de parasitas, enquanto os animais controle já haviam resolvido a infecção [25]. Esses dados, tomados em conjunto, sugerem que durante a infecção por *L. donovani*, IL-10 poderia ter um papel importante na supressão e regulação da resposta do tipo Th1. A supressão das células Th1 levaria à proliferação exagerada dos parasitas no fígado impedindo, ou retardando o controle da doença [26].

Vários antígenos de *Leishmania* têm sido descritos como candidatos a composição de uma vacina contra a doença, como A2, LACK, gp63, GP46/M2, Lcr1 e rGRP78 [27]. Os antígenos da família A2 são especialmente interessantes por serem expressos exclusivamente nas formas amastigotas, encontradas nos macrófagos do hospedeiro vertebrado [28, 29]) e terem papel importante na visceralização da doença, sendo, portanto, considerados fatores de virulência das espécies causadoras de leishmaniose visceral [29].

As proteínas A2 foram primeiramente descritas por Charest e Matlashewski, em 1994, como uma proteína citoplasmática especificamente expressa no estágio amastigota de desenvolvimento da *Leishmania donovani*. Em 1997, Zhang e Matlashewski demonstraram a perda de virulência da *L. donovani* quando a expressão dos genes de A2 fora silenciada pela técnica de RNA antisense. Apesar das amastigotas silenciadas serem capazes de infectar macrófagos em cultura, sua replicação se mostrou retardada, quando comparada à do tipo selvagem. Nos testes in vivo, utilizando-se BALB/c, animais infectados com as amastigotas silenciadas apresentavam uma contagem menor de parasitas no fígado, quando comparados aos infectados pelo tipo selvagem. Quando a expressão de A2 era restabelecida, a capacidade de proliferação das leishmanias se normalizava [30].

Outro indicativo da participação da proteína na visceralização da doença ficou evidente quando *L. major*, transformadas para expressar a proteína A2 de *L. donovani*, passaram a apresentar maior tropismo pelas vísceras, principalmente baço,

sobrevivência reduzida do parasita nos tecidos epiteliais. Isso indica que a perda ou ganho da proteína A2, ao longo do desenvolvimento das diferentes espécies de *Leishmania*, pode ter sido um dos fatores responsável pelo desenvolvimento do “tropismo” espécie específico. Apesar das indicações de envolvimento na visceralização da doença, a função de A2 ainda não foi identificada e pode envolver a participação de outras proteínas específicas do estágio de desenvolvimento [31].

Através de análises de cariótipo, os genes A2 foram também identificados nas espécies *L.donovani*, *L.chagasi*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (espécies do Novo Mundo), mas não nas espécies *L. tropica*, *L.aethiopica* e *L. major*, (no Velho mundo) e *L.braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (do Novo Mundo), responsáveis pela forma cutânea da doença [32]. Atualmente, sabe-se que existe uma família de genes A2, composta por pelo menos sete deles, responsáveis pela codificação de uma família de proteínas com tamanho variando entre 45 e 100 kDa, devido ao número variável de repetições de 10 aminoácidos, ilustrada na figura 1 [31].

Em 2005, estudo realizado por Garin e colaboradores, utilizando as já citadas espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea no Velho Mundo, demonstrou que essas espécies possuem o gene de A2, porém, nestas, ele é de cópia única, com apenas 153pb, de sequência extremamente conservada, codificando uma proteína de apenas 51 aminoácidos, sendo funcionalmente transcrito em ambos os estágios de desenvolvimento. Essas características são muito diferentes do gene A2 das espécies causadoras de leishmaniose visceral, uma vez que nessas, o gene A2 se apresenta em várias cópias, podendo ter tamanho variado e expressão preferencial ou exclusiva no estágio de amastigota [31].

Em 2006, o grupo de pesquisa liderado por Wilson, M.E. realizou a comparação das seqüências dos genes das proteína A2 de *L. donovani* e *L. chagasi* e encontrou 97% de identidade (Figura 1). Os polimorfismos encontrados estavam localizados principalmente nas regiões N e C terminais da proteína não havendo variabilidade significativa nas seqüências repetitivas [33].

648 cDNA sequence	01	QAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGP
Li sequence (Sanger)	01	VGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPL--G-QA-GP
A2 (NCBI)	01	MKIR--R-LV-LL
648 cDNA sequence	15	LSVGPPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSV
Li sequence (Sanger)	58	LS-GPQAVGPL-VGPOQSVGPLS---O---L---S-----S-----S-----S---
A2 (NCBI)	03	VC-AAVLALSA-AEPHK.AAVD---L---Q---A-----A-----A-----A---
648 cDNA sequence	72	GPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPL
Li sequence (Sanger)	114	-----PQA-----P-----A-----A-----A-----A-----A-----A---
A2 (NCBI)	59	-----....-----S-----S-----S-----S-----S-----S-----S---
648 cDNA sequence	129	SVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVG
Li sequence (Sanger)	170	-----A-----A-----P-A-----A-----A-----A-----XA---
A2 (NCBI)	111	-----S-----S-----S-S-----S-----S-----S-----QS---
648 cDNA sequence	186	PLSVGPQSVGPLS VGLQAVDVSPVS*
Li sequence (Sanger)	226	----D-----P-S-GPL....
A2 (NCBI)	168	----G-----P-S-DVSPVS-

Figura 1: Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína A2 de *L. donovani* e *L. chagasi*. As seqüências repetidas de 10 aminoácidos, VGPLSVGPQS. As seqüências hachuradas em verde e laranja são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal utilizado nesse trabalho como controle positivo da presença de A2. As seqüências sublinhadas em laranja e verde representam, respectivamente, os epítomos CD4-2 e CD8, mapeados por Resende, et al. 2008 [34]. Figura modificada e retirada de [33].

Em 2001, Ghosh e colaboradores realizaram um estudo de imunização em camundongos BALB/c com o DNA da proteína A2 inserido no plasmídeo pcDNA3.1-A2, e observaram que os animais imunizados apresentavam uma proteção substancial, representada pela queda em 65% do número de LDU (Leishman Donovan Units), contra o desafio com *L. donovani*. No mesmo ano, o grupo realizou novo estudo de imunização em camundongos com a proteína A2 recombinante e obtiveram um misto de resposta imune entre Th1 e Th2 e uma resposta humoral que conferia proteção aos animais desafiados com *L. donovani* [11].

Coelho e colaboradores, em 2003, demonstraram que a proteína A2 recombinante foi capaz de induzir proteção significativa, contra a infecção desafio por *L. amazonensis*, em camundongos BALB/c. A proteção foi avaliada através do tamanho e número de parasitas na lesão cutânea. O grupo imunizado apresentava perfil de citocinas do tipo Th1, e, mesmo após o desafio com *L. amazonensis*, os animais permaneciam com produção elevada de IFN γ e baixa de IL-4 e IL-10 [35].

Além da escolha do antígeno, para o desenvolvimento de vacinas torna-se importante a escolha de adjuvantes adequados. Com intuito de melhorar a resposta imune induzida por diferentes antígenos protéicos ou por DNA, vírus atenuados, como os adenovírus e o Vírus Vaccínia Ankara Modificado (MVA), têm sido utilizados em ensaios experimentais como vetores vacinais recombinantes. Os vetores virais carregam genes codificadores de antígenos, provenientes de diferentes patógenos, ao interior das células infectadas, onde as proteínas podem ser produzidas, processadas e apresentadas ao sistema imune. Dessa forma, a apresentação de antígenos se dá via MHC de classes I e II levando à ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de perfil Th1, produtoras de IFN γ , e ativação de células T CD8⁺ com atividade citotóxica, o que torna o emprego de vetores virais importante na elaboração de vacinas contra parasitas intracelulares, como *Plasmodium falciparum* [36] e espécies do gênero *Leishmania* contra os quais essa resposta é necessária para o controle e eliminação do parasita [12].

A imunização com DNA é conhecida por induzir a resposta de células T CD4⁺, estimulando a produção de anticorpos e de células T CD8⁺ via MHC classe I, com produção pronunciada de citocinas como IFN γ . A utilização de protocolos de dose

reforço em que se utilizam DNA como dose inicial e o MVA no reforço estão sendo amplamente utilizados, principalmente porque sabe-se que o MVA é potencializador da resposta gerada inicialmente pela imunização com o DNA [37].

Poxvírus recombinantes expressando genes exógenos são importantes ferramentas no desenvolvimento de vacinas. Por apresentarem genoma de grande tamanho, comparativamente ao de outros vírus, os poxvirus são capazes de acomodar grandes fragmentos de DNA exógeno. Além disso, são capazes de controlar precisamente sua expressão gênica, não se integram ao genoma da célula hospedeira e apresentam alta imunogenicidade, pois ativam o sistema imune celular e humoral do hospedeiro [38].

Os vírus vaccínia recombinantes podem ser utilizados em protocolos de vacinação animal, mas a utilização destes em humanos não é recomendada, uma vez que não são vírus completamente atenuados e seu uso é desaconselhado em indivíduos imunocomprometidos. Vírus recombinantes gerados a partir de poxvírus incapazes de se replicar em células de mamíferos, como o Vírus Vaccínia Ankara Modificado (MVA) têm sido desenvolvidos com o propósito de imunização humana [39].

O MVA é um vírus vaccínia altamente atenuado, não replicativo em células de mamíferos, obtido por Mayr e colaboradores, em 1974, a partir de um vírus vaccínia isolado na cidade de Ankara (vírus Ankara), através de 574 passagens sucessivas em ovos embrionados. Análises genéticas em que foram comparados o vírus selvagem CVA e o MVA, originado a partir do CVA, mostraram que durante o processo de atenuação, genes virais abrangendo 15% do genoma parental foram perdidos. A perda gerou seis grandes regiões de deleção, numeradas de I a VI [40]. As deleções I e IV estão localizadas nas extremidades direita e esquerda do genoma viral, enquanto que a deleção II afetou dois terços do gene K1L, responsável pela capacidade viral de infectar células de mamíferos. Por sua vez, a deleção III levou à perda de um fragmento de 3,5kb que incluía um sítio único de restrição da enzima SmaI. Somadas, as deleções V e VI representam a perda de 8,5kb do genoma viral. Após as sucessivas perdas genéticas, o genoma do MVA foi reduzido de 208kb para 177kb [41].

Estudos de microscopia eletrônica indicam que o processo de atenuação prejudicou os passos finais de morfogênese viral. O processo de morfogênese dos vírus vaccínia ocorre no citoplasma das células e é bastante complexo. Brevemente, nele há formação de duas formas infectantes principais os IMVs (Vírus Intracelular Maduro) e os

EEVs (Vírus Envelopado Extracelular) e várias outras formas intermediárias, entre elas, os IV (Vírus Imaturos) gerados no início da replicação. Uma pequena parte dos IMVs se transforma nos EEV, passando por processos de adição de duas membranas, provenientes de vesículas intermediárias entre o retículo endoplasmático e o aparato de Golgi. Por fim os vírions envelopados são liberados da célula através da fusão de seu envelope mais externo à, membrana citoplasmática. A comparação da infecção de células humanas da linhagem HeLa infectadas pelos vírus vaccínia Ankara selvagem ou modificado (MVA), mostrou que apesar de apresentarem proporções semelhantes de partículas na forma de IV, a forma IMV era menos freqüente na infecção por MVA, enquanto que a forma IMV atípicos (não infectantes) eram mais abundante na infecção pelo MVA [42]. Assim, isso indica que, apesar de genes importantes no ciclo de replicação viral terem sido perdidos, as alterações no processo de morfogênese viral nos MVAs prejudicam, apenas, os passos finais da morfogênese viral, comprometendo a formação de partículas infectantes. Contudo, não houve alterações nas etapas precoces e tardias da expressão de genes virais ou nos níveis de expressão de proteínas exógenas [38].

Durante os estágios finais do programa de erradicação de smallpox na Alemanha e Turquia o MVA foi inoculado em cerca de 120.000 pessoas sem nenhum efeito colateral notificado. Mesmo em experimentos utilizando animais imunossuprimidos e humanos constituintes de grupos de risco, o MVA se mostrou avirulento e incapaz de produzir partículas virais infectantes [38].

Por sua segurança comprovada, o MVA é um dos vírus de escolha para ensaios de imunização pré-clínicos e clínicos, podendo ser utilizado tanto em animais previamente imunizados contra o vírus, quanto em animais que nunca entraram em contato com o agente. No primeiro caso, apenas uma dose vacinal pode ser administrada, uma vez que a resposta gerada contra o próprio vetor viral dificulta a geração da resposta imunológica contra o patógeno de interesse. No segundo caso, duas doses vacinais podem ser administradas (dose-reforço homólogo) sendo que, apenas a partir da terceira dose, seria observada queda significativa da resposta imune contra o patógeno [43]. Assim sendo, faz-se necessária a utilização de protocolos de imunização dose-reforço heterólogo, em que se utilizam dois ou mais veículos diferentes para carrear construções do mesmo antígeno ou a ele relacionadas [44].

A construção de MVA recombinante para uso vacinal tem sido proposta em modelos experimentais para várias doenças, codificando diversos antígenos, como: TEMPk de *Mycobacterium* causador de tuberculose murina [45], gag, env e protease de HIV [46], a seqüência mel3 codificadora de antígenos de melanoma [47], ME-TRAP [48] e RTS de *P. falciparum* [36], proteína spike do coronavírus SARS [49], o antígeno LACK de *Leishmania* [12] entre muitos outros. Nesses modelos, o MVA é utilizado para reforçar a resposta imune inicial gerada pela imunização normalmente com DNA ou MVA [44].

Além dos MVAs, os adenovírus também têm sido utilizados para transferir seqüências codificadoras de epítomos imunogênicos ou antígenos de vários agentes infecciosos e também de tumores. Vários adenovírus recombinantes foram gerados em todo o mundo, como os que codificam os antígenos estruturais do vírus da hepatite C [50], os antígenos env, e tat do HIV, [51], glicoproteínas do vírus da raiva [52], gp55 do vírus da peste suína clássica [53], proteína CS do *Plasmodium yoelii* [54], os adenovírus recombinantes expressando as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *Toxoplasma gondii* [55] e a proteína A2 de *L. donovani*, construídos em nosso laboratório por Resende et al. 2008 [34].

Adenovírus modificados utilizados como vetores em vacinação e terapia gênica são obtidos por meio de deleções de partes específicas do genoma, o que permite a inserção dos transgenes sem aumento excessivo do tamanho do genoma viral, mantendo-o dentro do limite de empacotamento do capsídeo [56]. Os vetores de primeira geração passaram por deleção das regiões E1 e/ou E3, o que permite inserções transgênicas de até 7 kilobases. Como os produtos de E1 são essenciais para a ativação da transcrição de E2 e produção das proteínas responsáveis pela replicação do genoma, a deleção resulta num adenovírus não replicativo. A multiplicação dos vetores E1 Δ é feita in vitro, em células transgênicas para E1, que oferecem seus produtos de maneira complementar. Os adenovírus deficientes em replicação podem expressar o transgene e induzir a resposta imune no organismo hospedeiro, mas não podem ser transmitidos de um indivíduo a outro. Isso torna segura a utilização dos vetores, eliminando o risco de propagação ambiental de um organismo geneticamente modificado [57].

Poucos trabalhos descrevem a utilização de adenovírus e poxvírus em protocolos heterólogos de imunização. Bruna-Romero, em 2001, descreveu protocolos heterólogos de imunização com diferentes intervalos entre as imunizações. No trabalho, a imunização inicial dos camundongos foi realizada com adenovírus recombinantes contendo o gene da proteína CS e os vírus vaccínia recombinantes, contendo o mesmo gene, foram utilizados no reforço. Após quatro semanas foi realizado o desafio contra *Plasmodium yoelii*. A proteção observada nos animais que receberam os dois vírus, com intervalo de oito semanas foi de 100%, e não houve proteção quando os animais foram imunizados apenas uma vez, com quaisquer dos dois vírus recombinantes. Isso indica a importância da utilização de protocolos de imunização heteróloga em que se utilizam vírus diferentes expressando o mesmo antígeno, na indução de proteção contra a infecção por um parasita intracelular.

Recentemente foi publicado um trabalho descrevendo a utilização do MVA em protocolo heterólogo de imunização juntamente com o Adenovírus. A vacinação dos animais C57BL/6 foi feita usando, na dose inicial, DNA ou adenovírus e dose de reforço o MVA. As doses de 10^8 pfu dos vírus MVA e Adenovírus por animal, sendo o MVA administrado via intravenosa e adenovírus, intramuscular. Todos os vetores apresentavam a mesma construção de antígenos provenientes de *Mycobacterium avium*. A resposta imune gerada nesses protocolos foi caracterizada pela alta estimulação de células produtoras de IFN γ e produção de anticorpos significativa. Essa resposta foi capaz de conferir proteção aos animais vacinados perante o desafio com *M. avium* [58].

2 Justificativa:

Considerando diferentes fatores como: (1) a gravidade das formas de leishmaniose, (2) as inúmeras limitações das ações profiláticas existente, como a impossibilidade de se eliminar os hospedeiros naturais das leishmanioses, e por outro lado, (3) a eficiência dos vírus MVA e adenovírus como vetores vacinais, (4) além das propriedades do antígeno A2, acreditamos ser de extrema importância a avaliação de protocolos heterólogos de imunização dose-reforço, utilizando o gene da proteína A2, os vírus MVA e adenovírus recombinantes para A2 em modelo animal, camundongos BALB/c. A partir da avaliação desse modelo, espera-se contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento de uma vacina mais eficiente no combate à infecção por Leishmania.

3 Objetivos do Projeto:

2.1 - Construir um vetor MVA recombinante que expresse a proteína A2 de *L. donovani* (MVA-A2).

2.2 – Testar as diferentes vias de imunização com MVA-A2, em protocolo heterólogo de imunização, utilizando o AdA2 como primeira dose.

2.3 - Imunizar camundongos BALB/c, em diferentes protocolos de imunização dose-reforço, empregando como vetores, além do MVA-A2, o Adenovírus-A2 (AdA2) e o plasmídeo pcDNA3.1-A2 (pA2).

2.4 - Caracterizar a resposta imune celular, por meio de ensaios de ELISPOT e de citotoxicidade in vivo, e humoral, por ELISA, induzidas pelos diferentes protocolos de imunização dose-reforço.

4 Metodologia:

4.1 Linhagens celulares:

Nos experimentos de geração, seleção e amplificação dos MVAs, bem como nos testes de expressão do gene recombinante, foram empregados fibroblastos de embrião de galinha (CEF) em cultivo primário (Earl, Moss et al. 2002). Para tanto, as células foram extraídas de embriões de galinha com quatro dias. Após a retirada das células diferenciadas, como as constituintes da cabeça, patas, coração e fígado, as células embrionárias foram individualizadas por tripsinização dos tecidos. Todo o procedimento e manuseio dos embriões foram realizados em local estéril. Após sua obtenção, as células foram mantidas em meio D-MEM suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino) a 37°C para realização dos experimentos.

Para a amplificação dos adenovírus recombinantes, foram empregadas células HEK293. Essa linhagem é composta de células de rim embrionário humano, as quais foram transformadas com fragmentos de DNA derivados da região E1 do genoma de adenovírus humano tipo 5. Essas células expressam fatores de transcrição E1 e são permissivas à replicação de adenovírus E1 Δ de primeira geração [59, 60]. Todo o procedimento de geração dos adenovírus recombinantes foi realizado pela doutoranda Daniela Melo [34].

4.2 Plasmídeos utilizados para geração do MVA-A2 e vacinação dos animais:

O fragmento de DNA contendo o gene codificador da proteína A2 foi retirado do plasmídeo pcDNA3.1-A2 (pA2), gentilmente cedido por Greg Matlashewski (McGill University, Quebec). O plasmídeo pLW44 [49] apresentado na figura 3A, gentilmente cedido por Dr. Bernard Moss, (Laboratory of Viral Diseases, NIH - Bethesda, EUA), foi usado para promover a recombinação homóloga com o genoma do vírus MVA selvagem. Esse plasmídeo, de 5028pb, apresenta um cassete de expressão, representado na figura 3B constituído das seqüências flanqueadoras, denominadas flancos 1 e 2, homólogas à região de deleção III do genoma do vírus MVA, o gene codificador da Green Fluorescent Protein (GFP), sob domínio do promotor p11 e o promotor mH5, seguido pelo sítio múltiplo de clonagem que apresenta os sítios de restrição das enzimas SmaI e XbaI.

```

1    gagctcccc agcgaccctc tcggcaacgc gagcgcccca gtccccccac gcacaacttt
61   gaccgagcac aatgaagatc cgcagcgtgc gtccgcttgt ggtgttgctg gtgtgcgtcg
121  cggcgggtgct cgcactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggccggccgtt gacgtcggcc
181  cgctctccgt tggcccgagc tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgagc gctgttgccc
241  cgctctccgt tggcccgagc tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgagc gctgttgccc
301  cgctctctgt tggcccgagc tccgttgccc cgctctccgt tggcccgctc tccgttgccc
361  cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggtc cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc
421  cgcagtccgt cggcccgctc tccgttgccc cgcaggctgt tggcccgctc tccgttgccc
481  cgcagtccgt cggcccgctc tctgttgccc cgcaggctgt tggcccgctc tctgttgccc
541  cgcagtccgt tggcccgctc tccgttgccc cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggtc
601  cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttgccc
661  cgcagtctgt cggcccgctc tccgttgccc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggtc
721  cgcagtccgt tggcccgctc tccgttgccc cgcagtccgt tgacgtttct ccggtgtctt
781  aaggctcggc gtccgcttct cgggtgtcgt aaagtatatg ccatgaggca tggtagcag
841  gcaaaccttg tcagcaatgt ggcattatcg taccgtgca agagcaacag cagagctgag
901  tgttcagggtg gccacagcac cagctcctg tgacactccg tggggtgtgt gtgacctgg
961  ctgctgttgc caggcggatg aactgcgagg gccacagcag cgcaagtgcc gctccaacc
1021 ttgcgacttt cagccacag acgcatagca gcgcctgcc tgcgcggcg catgcgggca
1081 agccatctag atgcgcctct ccacgacatg gccggaggcg gcagatgaag gcagcgaccc
1141 cttttcccg gccacgacgc cgcgtgagg cgggccccac agcgcagaac tgcgagcgcg
1201 gtgcgcgggc gctgtgacgc acagccggca cgcagcgtac cgcacgcaga cagtgcattg
1261 ggaggccgga ggagcaagag cggtaggacg gaacggcgcg aagcatgcgg cagccctcg
1321 atgtgcctgt gtgggctgat gaggcgcgga tgccggaagc gtggcgaggg catcccagt
1381 tgcaccgtcg agtctccag gcccgaaatg ggcgagcctg cggggagcag attatgggat
1441 gcggctgctc gaagcgaccg agggcgctga ccggaagggt gcccactcc tctcggggc
1501 tgtgcggcat ccgccctga tcgggagccc gaatggtggc cgcgcgggtg aaggcgtgcc
1561 gccacccgc gtctccgtgt ggcgcgctg ggggcagggt cgctgtggct gtgtatgtc

```

Figura 2: Sequência do fragmento de DNA codificador da proteína A2. O gene apresenta uma sequência inicial que codifica um peptídeo sinal seguida por um e o número variável de repetições dos nucleotídeos: CGCTCTCCGT TGGCCCGCAG TCCGTTCGGCC. Alguns polimorfismos podem estar presentes na sequência.

4.3 Construção do plasmídeo recombinante:

O gene codificador de A2 foi retirado do plasmídeo pcDNA3.1-A2 pelas enzimas XbaI e HindIII e inserido no plasmídeo vetor pLW44 no sítio de SmaI. Todas as enzimas utilizadas foram fornecidas pelo fabricante Invitrogen®.

O pLW44 foi digerido pela enzima SmaI, expondo um sítio com extremidades cegas. Em seguida, o gene codificador de A2 foi retirado pelas enzimas de restrição XbaI e HindIII, gerando extremidades coesivas. Esse fragmento foi tratado com T4 DNA polimerase. Para a ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase. Todas as reações foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante.

Para transformação das bactérias e amplificação do DNA plasmidial, foram utilizadas bactérias competentes E.coli XL1-blue. A purificação do DNA foi realizada com os seguintes kits: QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAfilter Plasmid Maxi e Giga Endofree Kit. Todos esses kits foram obtidos do fabricante Qiagen®.

O produto da ligação foi utilizado para transformar as bactérias e a triagem dos clones foi feita em duas etapas. Primeiramente, para caracterizar presença/ausência do inserto, cada clone gerado teve seu DNA extraído e então foram triados de acordo com o padrão de fragmentos obtido pela digestão com a enzima XbaI. Em seguida, para caracterizar as construções capazes de expressar A2, foi realizado Western Blot de células transfectadas com as diferentes construções.

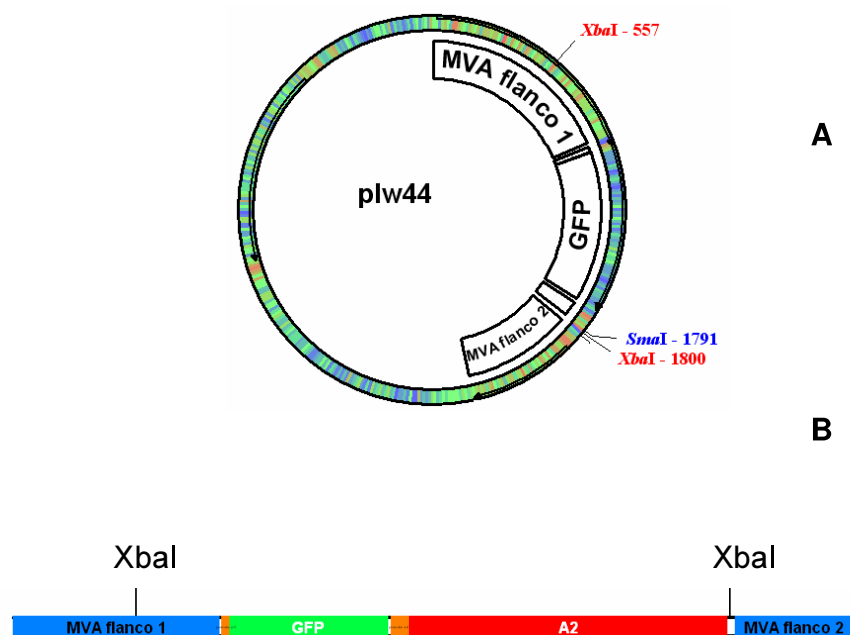


Figura 3: Esquema representativo do pLW44. **A** - plasmídeo pLW44 em que estão mostrados os sítios de restrição das enzimas XbaI e SmaI presentes no sítio múltiplo de clonagem. **B** – Esquema representando o cassete de expressão contendo o gene da proteína A2 inserido no sítio de restrição da enzima SmaI. No esquema, as regiões de homologia da região de deleção III do genoma viral, flancos 1 e 2, estão representadas em azul, o gene da GFP está apresentado em verde e o gene da proteína A2, em vermelho, as seqüências dos promotores p11 e mH5 estão representadas de laranja. Os sítios de restrição da enzima XbaI também estão identificados.

4.4 Produção e triagem do MVA-A2:

Os vírus MVA foram produzidos em duas etapas. Para a primeira, uma monocamada de CEFs, com 90% de confluência, foi infectada com 0,5 M.O.I.. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, por 2 horas. Decorrido o tempo, a monocamada foi transfectada com o pLW44-A2 utilizando-se o reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as indicações do fabricante. As células infectadas e transfectadas foram incubadas por um período de 48 horas a 37°C e 5% de CO₂, após o qual, as células foram coletadas.

A triagem dos MVA-A2 foi realizada em células permissivas, CEFs. A partir do lisado de CEFs transfectadas e infectadas, foi realizada a infecção de uma nova monocamada adicionando-se 1mL do lisado em diferentes diluições (de 10⁻¹ a 10⁻⁴). Após essa adição, as células foram mantidas por um período de 2 horas a 37°C e 5% de CO₂, após o qual, o lisado foi retirado. Então, à monocamada infectada, foi acrescentado 1mL de solução de agarose 2% e 1mL de meio D-MEM 2x, suplementado com 5% de SFB. As células foram mantidas por dois dias a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Após o período de incubação, a monocamada foi observada em microscópio de fluorescência invertido para observação dos clones de células infectadas por MVA-A2, expressando GFP. Os clones bem individualizados foram coletados e as células foram lisadas por choque térmico, para liberação dos vírus recombinantes. Para cada clone isolado foram preparadas diluições de 10⁻¹ a 10⁻³, posteriormente utilizadas na infecção de novas monocamadas de CEFs em placas de 6 poços. Após dois dias de incubação a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, novos clones foram coletados. O processo de seleção foi repetido por, no mínimo 3, vezes para assegurar a seleção apenas dos vírus recombinantes.

4.5 Purificação e titulação do MVA-A2:

A purificação dos MVA foi feita por gradiente de sacarose. Para tanto, o conteúdo de 30 frascos de 175 cm² de cultura de CEFs infectadas com MVA-A2 foi centrifugado, para retirada do meio de cultura, e sonicado (Ultrasonic processor, model GEX600), para que houvesse o rompimento da membrana celular e liberação dos vírus intracitoplasmáticos. O extrato foi homogeneizado em Doucer de vidro e posteriormente colocado sobre uma solução de sacarose a 36% em um tubo de ultracentrífuga estéril. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 2 horas a uma rotação de 13,500rpm (rotor

SW 27) e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo o vírus foi suspenso em trisHCl, pH 8,0 e sonificado por um minuto a potência máxima.

O gradiente de 24% a 40% de sacarose foi preparado no tubo de ultracentrífuga através da adição cuidadosa de 6,8mL de cada uma das soluções de sacarose a diferentes concentrações: 40%, 36%, 32%, 28% e 24%. O precipitado viral sonificado foi então adicionado ao gradiente e centrifugado por 90 minutos a 12,000rpm (rotor SW 27). A suspensão leitosa contendo o vírus na região central foi coletada e centrifugada por 1 hora a 12,000rpm (rotor SW 27). Após a centrifugação, o precipitado contendo o vírus foi suspenso em trisHCl, pH 8,0, dividido em alíquotas de 10 µL e armazenado a temperatura de -80°C.

A titulação dos vírus foi realizada em placas de 6 poços contendo uma monocamada de CEFs 90% confluentes. Para tanto, em 1mL de meio DMEM adicionou-se 1µL de MVA-A2 purificado e a partir dessa solução estoque realizou-se diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-10} . Em cada poço, foram adicionados 500µL de cada diluição e após 2 horas de adsorção, adicionou-se 1,5mL de DMEM 2,5% em cada poço. Após 48h de incubação a 37°C em ambiente com 5% de CO₂, ao microscópio de fluorescência invertido, cada aglomerado de células fluorescentes, que expressava GFP, foi contada como uma unidade formadora de placa (p.f.u.). Assim, o título foi definido na diluição que apresentou 30 a 300 placas.

4.6 Análise da expressão da proteína A2 pelos MVA-A2:

A produção da proteína A2 por células infectadas pelo MVA-A2 ou pelas construções pLW44-A2 indicou a clonagem correta dos vetores. Esse aspecto foi avaliado por Western Blot em condições desnaturantes, da seguinte forma:

Extratos de CEFs transfectadas com o plasmídeo pLW44 e/ou infectadas com o MVA selvagem ou MVA-A2 foram suspensos em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol 6X. As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE a 12% e, em sequência, transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad). As membranas foram bloqueadas durante a noite em tampão de bloqueio (PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 5% de leite desnatado). No dia seguinte, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal C9 específico para a proteína A2, gentilmente cedido por Greg Matlashewski (McGill University, Quebec), diluído 1:3.000 em tampão de bloqueio, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 vezes por

5 minutos, em tampão de bloqueio e incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho (Sigma) diluído 1:5.000 em tampão de bloqueio, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Após a adição do anticorpo secundário, as membranas foram lavadas 5 vezes em PBS com 0,01% de Tween e 2 vezes em PBS puro. A revelação foi realizada através da incubação das membranas no reagente quimioluminescente ECL Western-Blot Analysis System[®] (Amersham Biosciences) e exposição em filme fotográfico.

4.7 Animais:

Em todos os experimentos de imunização foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, obtidas no CEBIO, UFMG.

4.8 Preparação dos antígenos de *L. chagasi*:

Para avaliação da imunidade humoral, foram utilizados antígenos solúveis de *Leishmania* nas fases promastigota e amastigota e a proteína A2 recombinante. Para a obtenção do SLA de promastigotas, um cultivo de *L. chagasi* com aproximadamente 1×10^8 promastigotas/mL foi centrifugado a 3300rpm e lavado 3 vezes com 10mL de PBS 1x. Em seguida, o sedimento contendo as leishmanias foi suspenso em 2mL de PBS e reservado a temperatura de -20°C.

Para a indução das amastigotas e produção do SLA, um cultivo com aproximadamente 1×10^8 promastigotas/mL foi centrifugado e suspenso em 100% de SFB e incubado a 37°C por 48h. Decorrido esse tempo, as formas amastigotas foram centrifugadas a 3300 rpm e o precipitado foi lavado com 10mL de PBS por três vezes. O sedimento foi então suspenso em 2mL de PBS 1x e congelados a -20°C. As leishmanias foram então lisadas por 3 ciclos de choque térmico. Para lisar as células mais resistentes, as leishmanias foram sonicadas em banho de gelo durante 3 ciclos de 30 segundos de sonicação (Ultrasonic processor, model GEX600) a amplitude de 30% e 30 segundos de banho de gelo.

A proteína A2 recombinante foi produzida, purificada e gentilmente cedida pela empresa Hertape. A proteína A2 é expressa em fusão com seis resíduos de histidina aminoterminal. A purificação foi feita através da cromatografia de afinidade em coluna contendo resina com íons níquel [61]. No final do processo de purificação, as proteínas são separadas da resina por competição com imidazol (Qiagen, The QIA expressionist, 2003).

Brevemente, as bactérias contendo o plasmídeo A2-pET16b foram plaqueadas em meio LB-ágar (NaCl 1,25g, triptona 2,50g, extrato de levedura 1,25g e ampicilina 100µg/mL) e as placas foram incubadas em estufa a 37°C. Uma colônia isolada foi extraída e acrescentada à 10mL do meio LB líquido (NaCl 5,0g, triptona 10,0g e extrato de levedura 5,0g) acrescido de ampicilina (100µg/mL). Esse cultivo foi deixado sob agitação constante por 16 horas, à 37°C. Em seguida, foi feito o inóculo a partir desse cultivo (diluição de 1:100) em 250 mL de meio LB com ampicilina. O cultivo foi deixado sob agitação, à 32°C, até atingir a densidade ótica de aproximadamente 0,5 à 600nm, o que corresponde a uma concentração de bactérias de aproximadamente 2×10^8 /mL. Em seguida foi feita a indução da expressão das proteínas pela adição de 1mM de IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo, Invitrogen). Os cultivos foram mantidos sob agitação constante, à 32°C, durante 2 horas. Ao final, as células foram separadas por centrifugação e o sedimento foi congelado à -20°C.

Para lise das bactérias, as células foram submetidas a cinco ciclos de choques térmicos e finalmente, as suspensões foram submetidas a seis ciclos de 30 segundos de ultrasonicação (Ultrasonic processor, model GEX600), seguido por intervalos de mesmo tempo, à amplitude de 35 Mhz. A purificação foi feita através de cromatografia de afinidade em colunas contendo resina com íons níquel. A porção purificada foi dialisada em membranas (Spectra por 12-14000, 25mm) em PBS 0,1X, pH 7,2 por 48 horas, à 4°C e sob agitação constante.

4.9 Protocolos de imunização:

4.9.1 Análise comparativa das vias de imunização:

Para o teste das diferentes vias de imunização com MVA-A2, grupos de 5 animais foram submetidos às diferentes vias de imunização discriminadas na Tabela 1:

Grupos	Primeira dose			Intervalo (semanas)	Segunda dose		
	Vetores	Doses	Vias		Vetores	Doses	Vias
AdA2	AdA2	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	————	————	———
AdMVAA2 im	AdA2	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	MVAA2	1x10 ⁷ pfu	i.m
AdMVAA2 id	AdA2	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	MVAA2	1x10 ⁷ pfu	i.d
AdMVAA2 sc	AdA2	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	MVAA2	1x10 ⁷ pfu	s.c

Tabela 1: Análise comparativa das vias de imunização. Vias de imunização - i.d: intradérmica, i.m: intramuscular e s.c: subcutânea.

O adenovírus recombinante, AdA2, foi diluído em meio DMEM estéril e administrado por via subcutânea, na base da cauda, num volume final de 100µL em todos os grupos de animais. A dose do MVA recombinante, MVA-A2, foi diluída em PBS 1x para volumes diferentes, dependendo da via de imunização, sendo: intramuscular - 20µL acrescidos de 20µL solução de sacarose 50% e administrado no quadríceps esquerdo, intradérmica - 10µL administrados na orelha esquerda e subcutânea - 100µL, administrados na base da cauda.

Os animais que receberam doses vacinais pelas vias intradérmica e ou intramuscular foram previamente anestesiados, com 60µL de uma solução de ketamina 20mg/mL e xilasina 1,3mg/mL.

Quinze dias após as imunizações, os animais foram sacrificados para extração do baço para experimentos de citotoxicidade in vivo e estimulação in vitro dos esplenócitos para análise da resposta imune celular por ELISPOT.

4.9.2 Vacinação dos animais:

Os camundongos BALB/c foram divididos em cinco grupos de 6 animais, de acordo com a Tabela 2:

Grupos	Primeira dose			Intervalo (semanas)	Segunda dose		
	Vetores	Doses	Vias		Vetores	Doses	Vias
PBS	PBS	100µL	i.d	4	PBS	100µL	i.d
AdMVACtrl	AdASP	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	MVAGFP	1x10 ⁷ pfu	i.d
AdMVAA2	AdA2	1x10 ⁹ pfu	s.c	6	MVAA2	1x10 ⁷ pfu	i.d
pA2	pcDNA3.1A2	100µg	i.m	4	pcDNA3.1A2	100µg	i.m
pMVAA2	pcDNA3.1A2	100µg	i.m	4	MVAA2	1x10 ⁷ pfu	i.d

Tabela 2: Grupos de vacinação dose-reforço heterólogo. Vias de imunização - i.d: intradérmica, i.m: intramuscular e s.c: subcutânea.

Os adenovírus recombinantes, AdA2 e AdASP (controle), foram diluídos em meio DMEM estéril e administrados por via subcutânea num volume final de 100µL. A dose dos MVAs recombinantes, MVA-A2 e MVA-GFP (controle), foi diluída em 10µL de PBS 1x estéril e administrada via intradérmica na orelha esquerda. O plasmídeo pcDNA3.1-A2 foi diluído em PBS 1x para volume de 20µL acrescidos de 20µL solução de sacarose 50% e administrado via intramuscular, no quadríceps esquerdo.

Os animais que receberam doses vacinais pelas vias intradérmica e/ou intramuscular foram previamente anestesiados, com 60µL de uma solução de ketamina 20mg/mL e xilasina 1,3mg/mL. Após o procedimento de vacinação, os animais foram acompanhados até que seu comportamento normal fosse restabelecido.

Doze dias após as imunizações, foram coletadas amostras de soro dos animais de cada grupo. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento dos testes de ELISA. Quinze dias após as imunizações, três animais de cada grupo foram sacrificados para extração do baço e estimulação in vitro dos esplenócitos para análise da resposta imune celular por ELISPOT e os demais animais foram sacrificados para extração de baço para os experimentos de citotoxicidade in vivo.

4.10 Avaliação da Resposta imune humoral e celular:

4.10.1 Resposta Humoral:

Para verificar a produção de anticorpos nos animais vacinados, as amostras de soro foram submetidas à reação imunoenzimática (ELISA) contra SLA de amastigota e

promastigota de *L. chagasi* e proteína recombinante A2 (rA2). Soros de animais infectados com *L. chagasi*, usados como controle positivo, foram gentilmente cedidos pela Profa. Simone Aparecida Rezende do Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto.

O reconhecimento de rA2, e dos SLA's pelos soros de animais imunizados, infectados ou pelo anticorpo monoclonal C9 para a proteína A2 foi identificado da seguinte forma: placas Maxisorp[®] (Nunc) foram sensibilizadas com 500ng de rA2, SLA de promastigota e de amastigota diluídos em tampão carbonato (15mM de carbonato de sódio e 34mM de bicarbonato de sódio, pH=9,6) e aplicados nas placas (100µL/poço) para sensibilização durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com 100µL/poço tampão de bloqueio (PBS acrescido de 2% de leite desnatado), durante 60 minutos, a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 e incubadas com os soros dos camundongos imunizados diluídos 1:100 em tampão de incubação (PBS acrescido de 0,25% de leite desnatado e 0,05% de Tween 20), durante 60 minutos, a 37°C. Após três lavagens, as placas foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG total de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma) diluída 1:2000, durante 60 minutos, a 37°C. Após seis lavagens as reações de reconhecimento foram reveladas com 100µL por poço de solução comercial de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma) e interrompida com 50µL por poço de H₂SO₄ diluído 1:20 em água deionizada. A leitura da absorbância das reações foi realizada a 450nm.

4.10.2 Resposta celular:

A técnica de ELISPOT foi adaptada do protocolo anteriormente descrito [62]. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com fundo de nitrocelulose (Millipore) previamente incubadas durante a noite, a 4°C, com 50µL por poço de anticorpo monoclonal anti IFN-γ (Pharmlingen) diluído a 5µg/mL em PBS estéril. Antes da adição das células, as placas foram bloqueadas durante 2 horas, a 37°C, com 200µL por poço de DMEM completo.

Os baços de cada animal de cada grupo foram macerados separadamente, com lâmina de vidro de borda fosca, em 5mL de DMEM completo. Os extratos totais de baço foram centrifugados a 1500rpm, por 10 minutos, suspensos em tampão de lise de hemácias (ACK), composto de 150mM de NH₄Cl, 1mM de KHCO₃ e 100µM de Na₂-

EDTA, e incubados durante 5 minutos em banho de gelo. Após o período, os esplenócitos foram lavados 3 vezes em DMEM completo a 1500rpm, por 5 minutos, e suspensos no meio contendo IL-2r.

Os esplenócitos foram plaqueados a 1×10^6 células por poço, no volume de 100µL por poço. A re-estimulação dos esplenócitos foi realizada por 20h a 37°C e 5% de CO₂, por diferentes estímulos, os peptídeos referentes aos epítomos CD4 e CD8 da proteína A2 recombinante (figura 1) descritos anteriormente [34], nas concentrações de 0,6mM e 1,2mM, respectivamente, Concanavalina A (ConA) controle positivo, na concentração de 10µg/mL, e meio RPMI suplementado com 5% de SFB inativado, como controle negativo. Foi utilizado o volume de 100µL de cada estímulo por poço. Após a re-estimulação, as células foram descartadas e as placas lavadas quatro vezes com PBS acrescido de 0,01% de Tween 20 (PBS/T20). A detecção do IFNγ foi feita com anticorpo monoclonal anti-IFN-γ conjugado com biotina (Pharmingen), o qual foi diluído a 2µg/mL em PBS/T20, adicionado às placas a 50µL por poço e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A detecção do complexo IFN-γ/anticorpo específico foi feita com conjugado de estreptoavidina-peroxidase (Pharmingen), diluída 1:2000 em PBS/T20 e incubada nas placas a 50µL por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente. Os spots foram revelados com 10mg de DAB (Sigma) diluído em tampão tris 0,1M, pH=7,4, acrescido de 0,001% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com água corrente.

4.10.3 Citotoxicidade in vivo:

Baços obtidos de animais livres de infecção e não vacinados (naïve) foram mantidos em 5mL de meio DMEM completo e macerados com lâminas de vidro foscas em grupos de 5 baços. As células foram lavadas e suspensas em 7mL de tampão de lise ACK e mantidas em banho de gelo por 5 minutos. Após a lise das hemácias, as células foram lavadas três vezes em DMEM completo, centrifugando a 1500rpm. Após a última lavagem, as células foram suspensas em PBS 1x.

As células foram então contadas e seu volume foi ajustado para uma concentração de 1×10^8 células/mL. Então, as células foram divididas em duas metades. A primeira metade foi marcada com uma solução de baixa marcação: solução de CFSE (Carboxi Fluoresceina Succinimidil Éster) a 1µM em PBS 1x a outra metade recebeu solução de alta marcação: solução de CFSE a 20µM em PBS 1x. As

marcações foram feitas misturando-se volumes iguais da suspensão de esplenócitos (10^8 células/mL) e solução de 2 ou 40 μ M de CFSE, para baixa e alta marcação, respectivamente. As reações de marcação foram incubadas durante 15 minutos a 37°C no escuro. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em DMEM completo e as de baixa marcação foram mantidas em banho de gelo, enquanto as células de alta marcação foram incubadas por 30 minutos a 37°C no escuro, com o peptídeo CD8 MHCII-ligante (alvo do reconhecimento por CTL) ou CD4, descritos anteriormente por [34]. Após esse período, as células de ambas as marcações foram lavadas 4 vezes em DMEM completo, por centrifugação a 1500rpm, a 4°C por 5 minutos. Na última lavagem, as células foram suspensas em DMEM sem soro.

A concentração das células foi ajustada para 2×10^7 /mL para que as células de alta e baixa marcação fossem misturadas numa mesma solução em concentrações iguais. Dessa mistura, 200 μ L/animal foi injetado pela veia lateral da calda de 3 camundongos de cada grupo vacinado.

Após 20-24 horas da inoculação das células alvo os baços desses animais foram recuperados e os esplenócitos foram separados, segundo a metodologia utilizada na preparação das células para ELISPOT. Porém, as células encaminhadas para a leitura no citômetro (FACScan) não foram suspensas em soluções contendo os diferentes estímulos, mas foram fixadas em 1mL de solução de formaldeído 2% em tampão de FAC's (0,25% BSA 1mM de azida sódica em PBS 1x). A aquisição das células no citômetro foi feita após 24h de fixação. Até o momento da aquisição, as células foram mantidas a 4°C em ambiente escuro.

O cálculo da porcentagem de lise específica foi feito de acordo com a seguinte fórmula: $100 - \text{porcentagem de CFSE}_{\text{alta obs}} / \text{CFSE}_{\text{alta esp}} \times 100$. Na fórmula, os termos $\text{CFSE}_{\text{alta obs}}$ representa o valor de células de alta marcação observado dentro do gate de linfócitos totais e $\text{CFSE}_{\text{alta esp}}$ representa o valor esperado de células de alta marcação na amostra, caso não haja lise específica dessas células, calculado por: $(\text{CFSE}_{\text{baixa}} \times \text{CFSE}_{\text{alta no grupo não vacinado}} / \text{CFSE}_{\text{baixa no grupo não vacinado}}) \times 100$.

4.11 Análise estatística:

Os dados foram submetidos à análise de comparação entre dois grupos, preferencialmente por teste t ou por teste de Mann-Witney. Todas as análises foram

feitas no programa SigmaStat. As amostras foram consideradas diferentes estatisticamente quando o valor de p encontrado foi menor que 0,05, no intervalo de confiança assumido de 95%.

5 Resultados:

5.1 Obtenção do MVA-A2:

Para a construção do plasmídeo recombinante, o fragmento de DNA contendo o gene da proteína A2 foi retirado do plasmídeo pcDNA3.1-A2, pela utilização das enzimas XbaI e HindIII e inserido no sítio de SmaI, presente no plasmídeo pLW44.

A confirmação da construção correta do pLW44-A2 foi conduzida primeiramente pela análise do padrão de fragmentos gerados pela digestão com a enzima XbaI, que indica presença / ausência de inserto e, posteriormente, pela detecção da proteína em extratos de células transfectadas com o pLW44-A2, que indica o sentido da clonagem do fragmento. Esse passo foi necessário, uma vez que a clonagem no sítio de SmaI foi realizada por meio de extremidades cegas e, portanto, existem chances iguais do inserto ser ligado no sentido correto e no sentido contrário.

Na Figura 4, em A e B, estão esquematizados os plasmídeos pLW44 e pLW44-A2. A digestão de pLW44 com a enzima XbaI, resulta em um fragmento de aproximadamente 3800pb e um fragmento menor de 1200pb correspondente à região contendo parte do cassete de expressão vazio. Na digestão do pLW44-A2 encontra-se um fragmento de 3800pb e outro contendo o cassete de expressão e o gene de A2, somando 2800pb. Na Figuras 4C e 4D são apresentados dados relativos à avaliação de treze clones testados de pLW44-A2 correspondentes aos números 1, 4, 10 a 12, 15, 17, 18 e 20 a 24. Todos os clones foram positivos para a presença do inserto. O pLW44 vazio foi usado como controle negativo.

Também foram realizadas tentativas de amplificação e seqüenciamento do gene codificador da proteína A2, porém, sem sucesso. Tal fato está relacionado à característica do fragmento que contém o gene de A2. Como indicado na figura 2, este gene de aproximadamente 1600bp é constituído por uma seqüência inicial que codifica um peptídeo sinal, seguida por uma seqüência de nucleotídeos que se repete diversas vezes e se estende até o final do fragmento. Essas repetições e o tamanho do fragmento dificultam reações que dependem de anelamento dos iniciadores, como PCR e seqüenciamento.

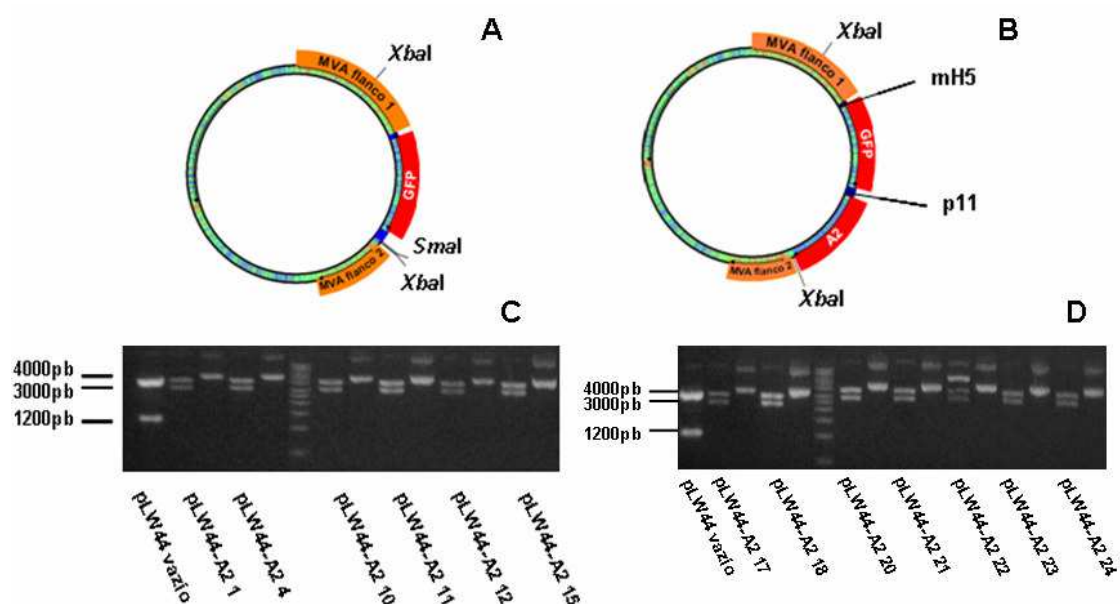


Figura 4: Clonagem do gene A2 no vetor pLW44. **A:** esquema do pLW44 antes da inserção do fragmento gênico da proteína A, onde estão mostrados os sítios de restrição das enzimas XbaI e SmaI. **B:** esquema do vetor após inserção do gene A2, mostrando os sítios de clivagem da enzima XbaI, os promotores, mH5 e p11 que compõem o cassete de expressão e os genes das proteínas GFP e A2. **C e D:** Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão dos clones de pLW44-A2 com a enzima XbaI. A primeira coluna dos géis contém o pLW44, controle negativo, onde estão evidentes dois fragmentos de 1200pb e 3800pb. Nas quatro colunas seguintes, sempre aos pares (digerido e não digerido) estão as treze construções testadas.

As construções dos plasmídeos positivos para a presença do inserto foram posteriormente testadas para a capacidade de expressão da proteína em CEFs. Para tanto, as células foram infectadas por vírus MVA selvagem e transfectadas com cada uma das construções positivas para a presença do gene.

Na Figura 5, a expressão da proteína A2 pode ser evidenciada pela presença de um sinal correspondendo a uma proteína de aproximadamente 58 kDa. O extrato de células infectadas com AdA2 foi utilizado como controle positivo. Os clones 4, 11, 15, 17 e 18 expressaram a proteína A2, enquanto os clones 1, 10, 12, 20 a 24 não foram capazes de expressá-la em quantidade detectável. Os clones 11 e 18 foram escolhidos para os experimentos de recombinação homóloga e geração MVA-A2.

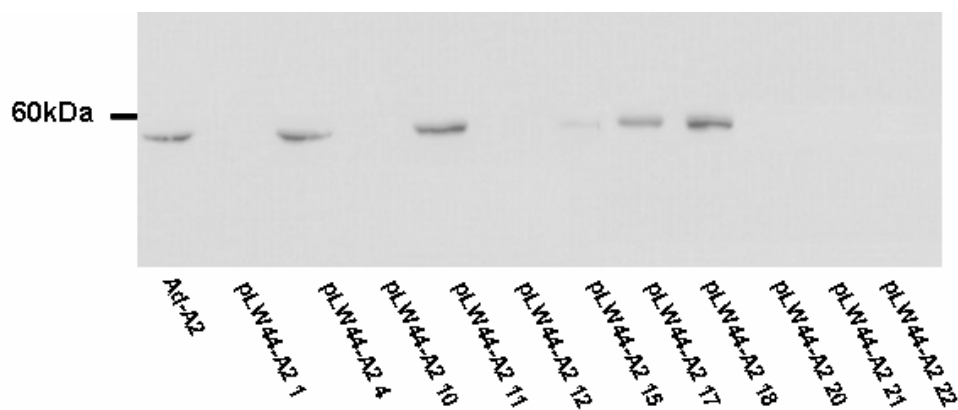


Figura 5: Análise de expressão da proteína A2. Infecção das CEFs com MVA selvagem seguida pela transfecção com as diferentes construções de pLW44-A2. Extratos de células transfectadas com os plasmídeos recombinantes foram testados contra anticorpo monoclonal C9 específico para proteína A2.

Os processos de produção e triagem dos MVA-A2 foram realizados com os vírus recombinantes provenientes da recombinação homóloga entre os dois plasmídeos escolhidos, pLW44-A2 clones 11 e 18. Porém, por conveniência, foi escolhido apenas o MVA-A2, proveniente da recombinação homóloga com o clone 18, para dar segmento aos processos de amplificação, confirmação da expressão da proteína A2 e purificação.

5.2 Análise da expressão da proteína A2 pelo MVA-A2:

A construção do MVA recombinante com o gene de A2 (MVA-A2) foi realizada por meio da recombinação homóloga entre o plasmídeo pLW44-A2, que apresenta duas regiões de homologia com regiões que flanqueiam a região de deleção III do genoma do MVA selvagem, chamadas, flanco 1 e flanco 2 e o MVA selvagem (Figura 6, A).

A indução da expressão de A2 pelo MVA-A2 foi confirmada em Western blot em que o extrato de células permissivas (CEF's) infectadas pelo MVA-A2 foi incubado com anticorpo monoclonal C9 (Figura 6, B). Nesse ensaio, o extrato de células não infectadas foi usado como controle negativo e o extrato de células infectadas com AdA2, foi usado como controle positivo. A presença de uma proteína de aproximadamente 60kda confirma a expressão de A2 no extrato de células infectadas pelo MVA recombinante. Nenhuma outra forma da proteína foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-A2.

A expressão da proteína A2 pelo MVA-A2 também foi testada em células de mamíferos, não permissivas, nas quais o vírus não se replica. Apesar de não se replicar nessas células, o MVA também foi capaz de expressar a proteína A2, porém em menores níveis (dado não mostrado).

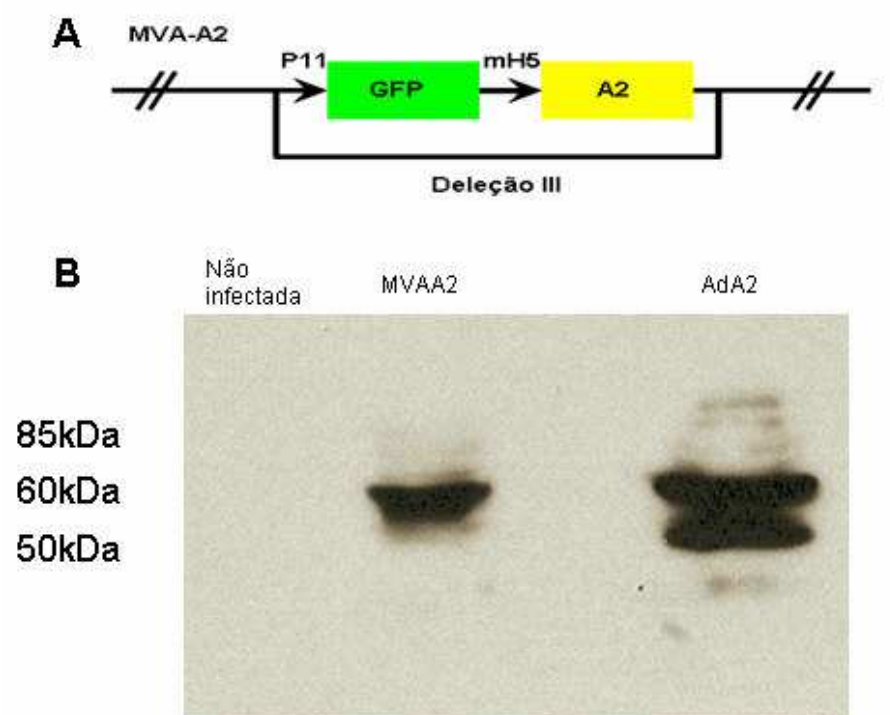


Figura 6: Geração do MVA recombinante contendo o gene A2 de *Leishmania*. **A:** esquema representando o MVA-A2, em que os genes das proteínas GFP e A2 foram inseridos na região de deleção III, no genoma viral. **B:** Extratos de células infectadas com os vírus AdA2, MVA-A2 ou não infectadas foram testados em Western-blot contra anticorpo monoclonal específico para proteína A2.

5.3 Análise comparativa das vias de imunização:

Para identificar qual seria a via de imunização capaz de induzir a maior resposta celular para a produção de IFN γ e de células T CD8⁺ citotóxicas, foi necessário realizar o teste das diferentes vias de imunização para o MVA-A2.

O esquema de imunização dos animais está detalhado na tabela 1. Portanto, apenas brevemente, os animais foram vacinados com uma dose de AdA2 e, após 6 semanas, receberam a dose de MVAA2. O grupo de animais controle recebeu apenas uma dose de AdA2. Assim, 3 semanas após as últimas imunizações os baços dos animais foram coletados para separação dos esplenócitos e avaliação da resposta imune por ELISPOT e citotoxicidade in vivo. Os animais que receberam a dose de MVAA2 via intradérmica apresentaram o dobro de células produtoras de IFN γ estimuladas com os peptídeos CD4-2 e CD8 (dados não mostrados) e o percentual de lise específica duas vezes maior que a obtida no grupo controle. No entanto, nos grupos de animais que receberam a dose de MVAA2 pelas vias intramuscular ou subcutânea não houve diferença significativa na indução de células TCD8⁺ citotóxicas por esses protocolos de vacinação, em comparação com o grupo imunizado apenas com AdA2.

Dessa forma, a via intradérmica foi escolhida para imunização dos animais com MVAA2.

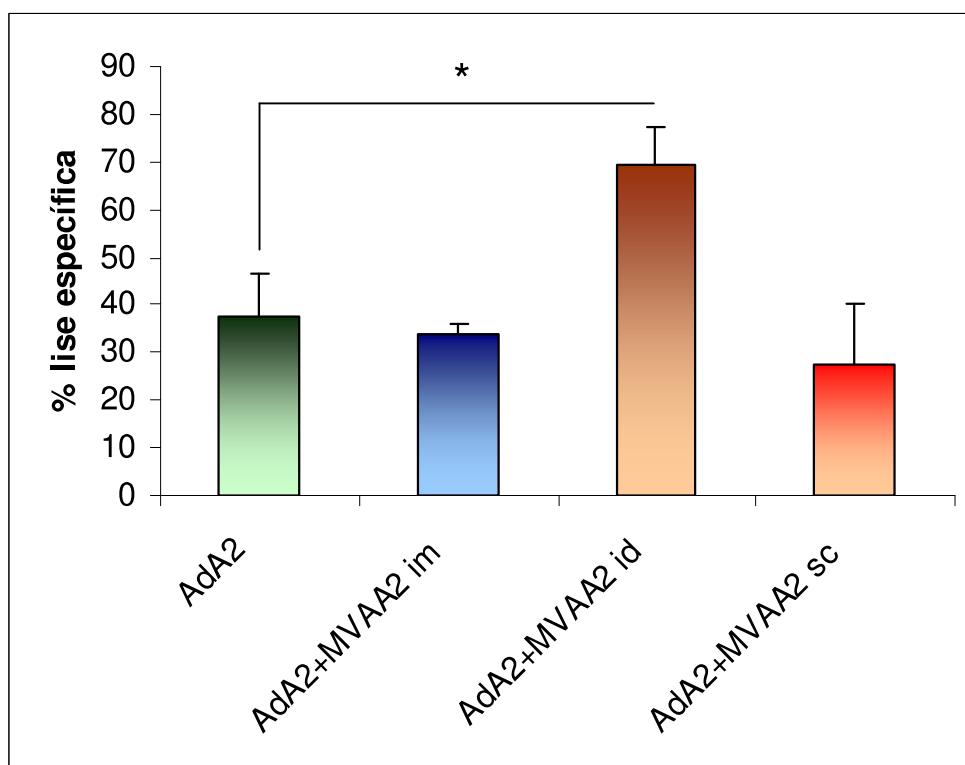


Figura 7: Citotoxicidade *in vivo* induzida pela vacinação com MVAA2 por diferentes vias de imunização. Três semanas após a última imunização, esplenócitos de animais naïve foram marcados com duas concentrações de CFSE (alta e baixa marcação). As células de alta marcação foram incubadas com peptídeo que representa um epítipo CD8 da proteína A2, as células de baixa marcação não receberam o peptídeo e serviram como controle interno. O gráfico mostra a porcentagem de lise das células marcadas com peptídeo CD8 em cada grupo de animais.

5.4 Avaliação da resposta imune celular:

Para a avaliação da resposta imune celular gerada após as doses de imunização, quinze dias após a última imunização, dois ou três animais de cada grupo foram sacrificados e esplenectomizados. Os esplenócitos foram purificados e re-estimulados com os peptídeos CD4 e CD8 de A2 em placas de ELISPOT para detecção de células produtoras de IFN γ , IL-10 e IL-4.

A figura 7 mostra os resultados dos ensaios de ELISPOT para avaliação das células produtoras de IFN γ . Pode-se observar que os animais do grupo AdMVAA2 apresentaram maior número de células produtoras de IFN γ específicas para os peptídeos CD4 e CD8. Não foi identificada a produção de IFN γ em ambos os grupos pA2 e pMVAA2. Nos grupos controle (AdMVACtrl e PBS) também não foi possível detectar a indução da resposta imune celular contra os peptídeos.

Nos ensaios de ELISPOT não foram detectadas células produtoras de IL-10 e IL-4 específicas para os epítomos testados, em quaisquer dos grupos avaliados. Contudo, nos controles positivos, em que as células foram estimuladas com ConA, houve proliferação de células produtoras de IL-4 e de IL-10, indicando a viabilidade celular (dado não mostrado).

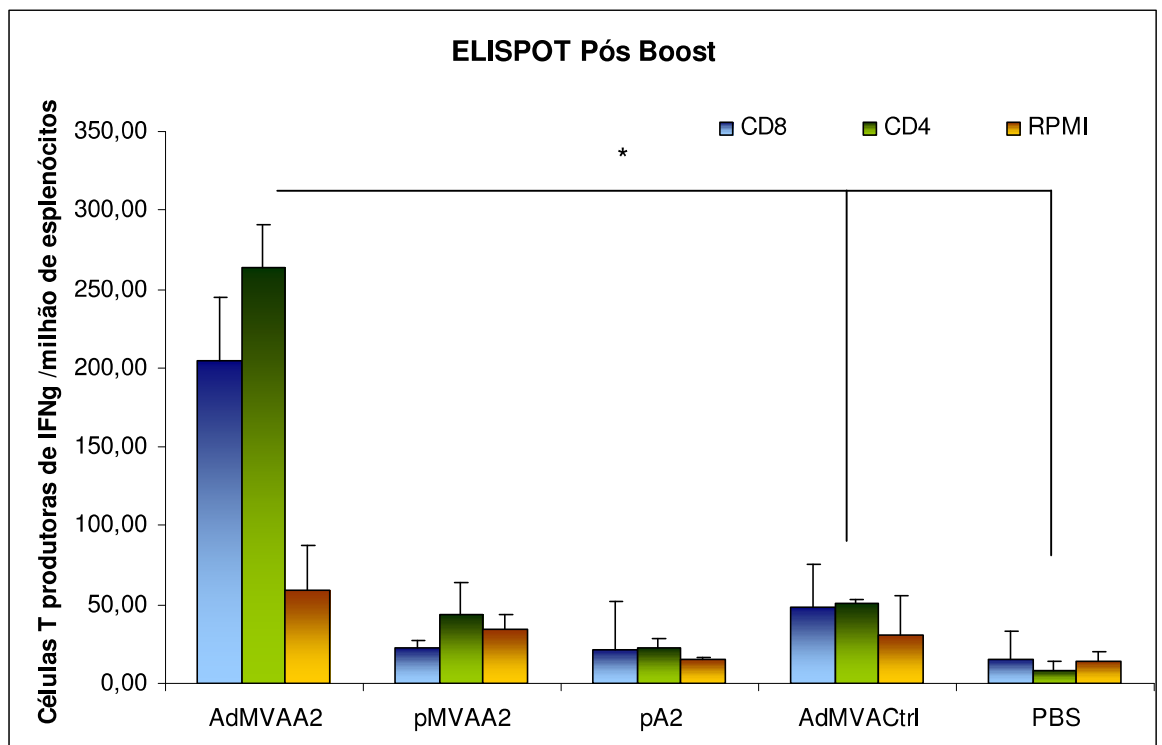


Figura 8: ELISPOT após dose de reforço. Avaliação de estimulação de células produtoras de IFN γ em animais vacinados nos diferentes protocolos de imunização. Os esplenócitos foram re-estimulados in vitro com os peptídeos representativos de epítomos CD4 e CD8 da proteína A2 e meio RPMI, como controle negativo. Esse resultado é representativo de dois experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ quando se comparou o grupo AdMVAA2 com os grupos PBS e AdMVACtrl.

Para avaliar capacidade das células T CD8⁺ induzidas pela vacinação de reconhecer e lisar células específicas que estivessem apresentando o peptídeo CD8, foi realizado o ensaio de citotoxicidade in vivo, em que células alvo estimuladas previamente com o peptídeo CD8 ou CD4 e marcadas com CFSE, foram injetadas em camundongos normais. Assim, caso este animal apresentasse células T CD8⁺ ativadas, essas seriam capazes de promover a lise específica de células estimuladas previamente com os peptídeos.

Os histogramas gerados pela análise das células na citometria, apresentados na figura 8A apresentam dois picos, o primeiro deles (M1) é constituído de células que receberam baixa marcação de CFSE e não foram, posteriormente, incubadas com peptídeos sintéticos. Por isso, elas representam o controle interno de cada amostra. O segundo pico (M2) é formado por células que receberam alta marcação de CFSE e foram posteriormente incubadas com os peptídeos CD8 ou CD4. Estas células, quando injetadas no animal vacinado, seriam potenciais alvos de lise específica. A diferença entre a área do M2 esperado e o M2 observado resulta na porcentagem de lise de cada grupo de animais vacinados.

O histograma da esquerda da figura 8A ilustra o resultado de um animal do grupo PBS e o histograma da direita apresenta o resultado de um animal do grupo AdMVAA2, em ambos, as células alvo foram incubadas com o peptídeo CD8. Pode-se perceber a redução nítida da área do pico M2. A porcentagem de lise específica de células incubadas com os peptídeos CD4 e CD8 foi representada na figura 8B. Apenas no grupo AdMVAA2 houve uma redução significativa do número de células alvo: em torno de 60%. Nos demais grupos vacinados, pMVAA2 e pA2, não foram identificados níveis de lise considerados significativos para o peptídeo CD8, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa comparando-se com o controle AdMVACtrl. Nos animais do grupo pA2 foi detectada uma porcentagem de lise irrelevante, cerca de 10%, quando as células foram estimuladas com o peptídeo CD4. Portanto, apenas o peptídeo CD8 foi capaz de ser reconhecido pelos linfócitos citotóxicos.

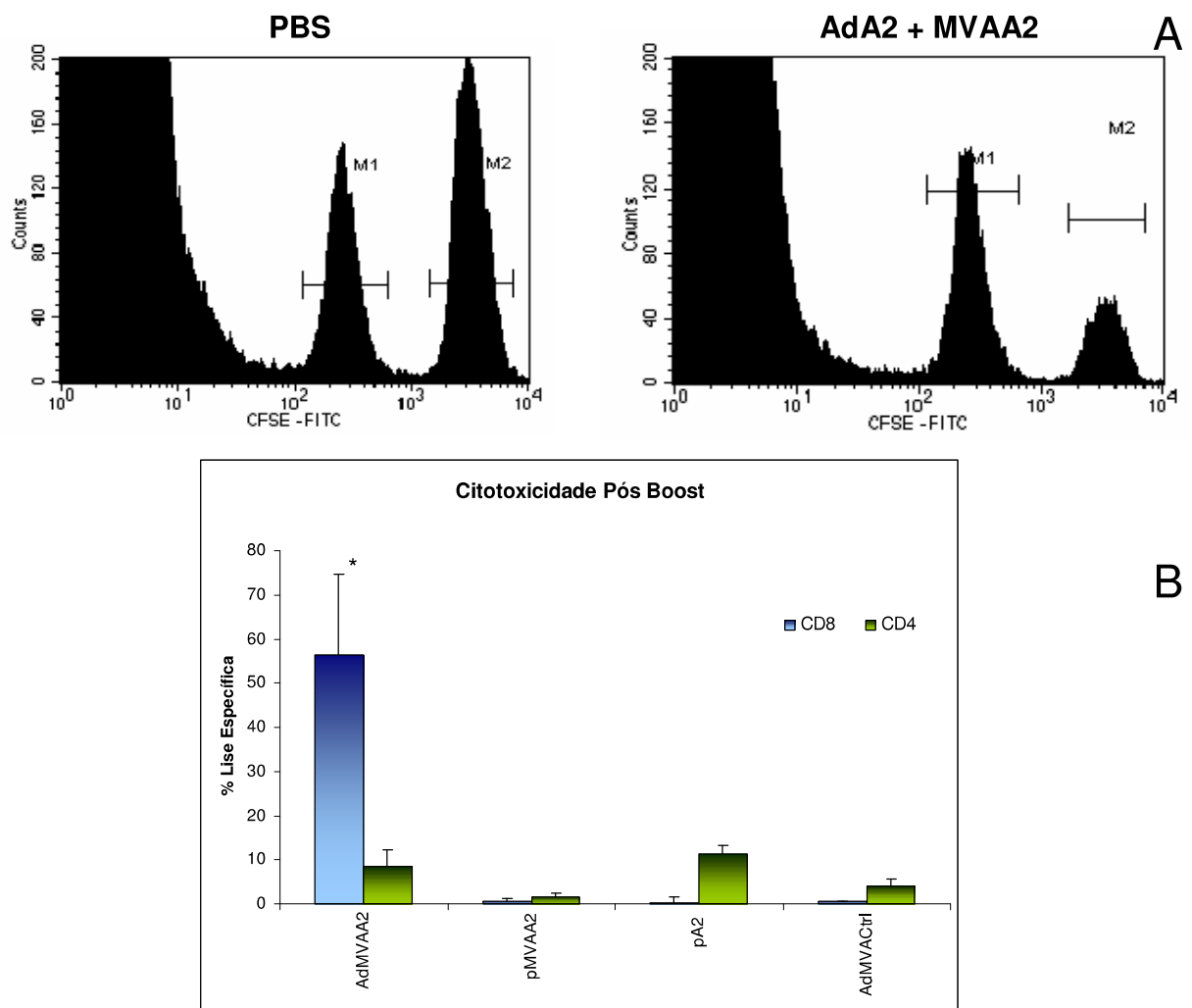


Figura 9: Citotoxicidade após a dose de reforço: As células de alta marcação foram incubadas com peptídeo que representa um epítipo CD8 ou CD4 da proteína A2, as células de baixa marcação não receberam o peptídeo e serviram como controle interno. As células foram inoculadas por via intravenosa na veia da cauda de dois animais de cada grupo vacinal. **A** - Histograma apresentando a aquisição de células de animal vacinado com PBS, à esquerda e AdMVAA2, à direita, mostrando os picos M1, baixa marcação, e M2, alta marcação. **B** – Porcentagem de lise específica para cada grupo vacinal, avaliada após 20h de inoculação. Esse resultado é representativo de dois experimentos realizados separadamente.

5.5 Avaliação da resposta imune humoral:

Amostras de soro foram coletadas dos animais, duas semanas após as imunizações. A reatividade do grupo PBS foi usada para estabelecer os pontos de corte (“cut off”), acima dos quais os soros dos animais foram considerados positivos. A figura 9 mostra os níveis de anticorpos produzidos contra SLA de promastigota, após a vacinação.

De maneira geral, em todos os animais vacinados, a indução de anticorpos contra o SLA de promastigota foi muito baixa. Isso era esperado, uma vez que a proteína A2 é expressa apenas pelas formas amastigotas. Contudo, quando se avaliam os níveis de anticorpos em soros de camundongos infectados por *L. chagasi*, observa-se diferença significativa, em comparação com os animais vacinados.

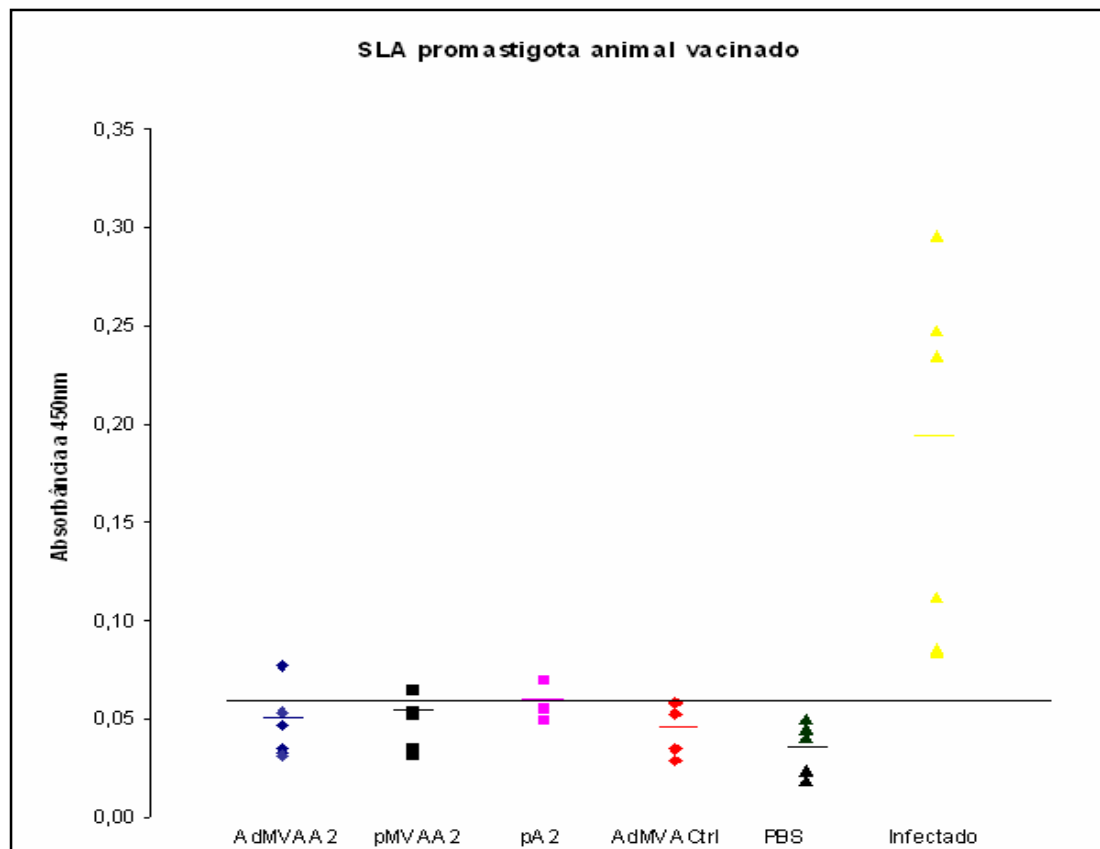


Figura 10: ELISA de soros de animais vacinados contra SLA de promastigota. As placas de ELISA foram estimuladas com 500ng de SLA de promastigota e os soros de animais de cada grupo vacinal foram testados para a produção de anticorpos, na diluição de 1:50. A linha contínua indica o ponto de corte (0,057), acima do qual os soros foram considerados positivos. Os soros dos animais foram coletados 12 dias após a segunda dose vacinal. Como controle positivo, foi utilizado soro de animal infectado por *L. chagasi*.

A produção de anticorpos contra SLA de amastigota também foi avaliada. Assim, o soro dos animais coletados no 12º dia após a segunda dose vacinal foi submetido à ELISA para SLA da forma amastigota (figura 10). Apesar dos animais do grupo pMVAA2 apresentarem um pequeno aumento na produção de anticorpos, em relação aos outros grupos, o nível total de produção ainda pode ser considerado baixo. De maneira geral, pode-se observar que não houve alta produção de anticorpos tanto nos animais vacinados com os diferentes protocolos, como nos animais infectados com *L. chagasi*.

Também foi testada a resposta humoral contra a proteína A2 purificada, não tendo sido observados níveis de produção de anticorpos em nenhum dos grupos de animais vacinados ou nos animais infectados, apesar de ter sido detectada alta reatividade em presença de anticorpo monoclonal anti-A2 (dados não mostrados).

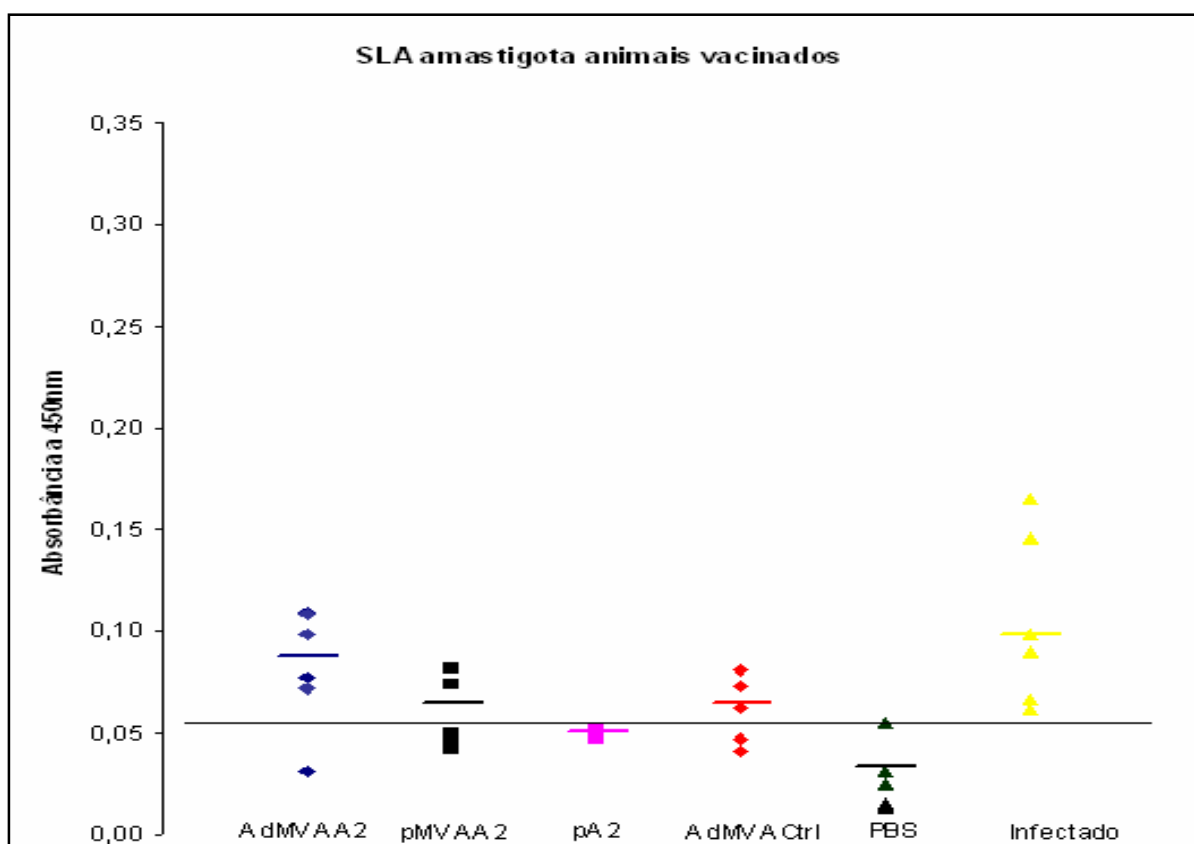


Figura 11: ELISA de soro de animais vacinados contra SLA de amastigota. As placas de ELISA foram estimuladas com 500ng de SLA de amastigota e os soros de cinco animais de cada grupo vacinal foram testados para a produção de anticorpos na diluição de 1:50. A linha contínua indica o ponto de corte (0,057), acima do qual os soros foram considerados positivos.

6 **Discussão:**

O vírus MVA-A2 construído foi capaz de expressar a proteína A2 em sua forma nativa in vitro tanto em células permissivas e não permissivas à multiplicação viral. No genoma do MVA selvagem foi inserido um fragmento de gene, indicado na figura 2, que apresenta aproximadamente 1600pb, e é constituído por uma seqüência inicial que codifica um peptídeo sinal seguida por uma seqüência de nucleotídeos CGCTCTCCGT TGGCCCGCAG TCCGTCGGCC que se repete um número variável de vezes e se estende até o final do fragmento.

Nos experimentos de confirmação da expressão de A2, foram usados extratos de células infectadas com o MVA-A2 e com AdA2, como controle, o anticorpo monoclonal C9 foi capaz de identificar duas seqüências localizadas no início da região de repetição da proteína, após a seqüência do peptídeo sinal: PHKAAVDVGPLSVGPQS e VGPQSVGPLSVGPQSVGPLS, visualizadas na figura 1 e descritas anteriormente por [34]. Nesse experimento não foi usado extrato de células infectadas com MVA selvagem, uma vez que para avaliar a correta orientação do plasmídeo, o MVA foi usado para infectar as células e, nesse ensaio, não houve o reconhecimento de fragmentos inespecíficos. Esse resultado sugere que o MVA-A2 seria capaz de produzir a proteína A2 in vivo nos animais vacinados.

Várias características da vacinação utilizando MVAs recombinantes como: vias de imunização; dose; número de doses; tipo de reagente utilizado nas primeiras doses e intervalo entre as doses variam muito dependendo do grupo de pesquisas envolvido no trabalho [48, 63]. Seria importante realizar o teste de algumas delas, em experimentos pilotos antes de experimentos de imunização propriamente ditos terem início. No entanto, considerando o tempo disponível para a execução deste trabalho, não seria viável o teste de todas as variáveis envolvidas na imunização dos animais.

Em diversos trabalhos, foi demonstrado que a rota de vacinação poderia alterar de forma significativa a amplitude da resposta imune induzidas, principalmente a indução de células T citotóxicas e os níveis de proteção induzidos pelas vacinações utilizando vírus recombinantes [63, 64]. Na literatura encontram-se descritas duas vias principais de administração dos MVA recombinantes, intradérmica e intramuscular, apesar de também serem descritas outras vias, como subcutânea, intraperitoneal e

intravenosa [65, 66]. Considerando as vias intraperitoneal e intravenosa pouco aplicáveis futuramente, em termos de vacinação de animais de maior porte, como cães e primatas não humanos, foram testadas as vias intradérmica, intramuscular e subcutânea.

A imunização do MVA-A2 por via intradérmica foi capaz de gerar uma maior quantidade de células produtoras de IFN γ (dados não mostrados) e, da mesma forma, induziu um maior percentual de lise específica in vivo mediante estímulo prévio das células alvo com o peptídeo CD8 da proteína A2, previamente descrito [34]. A via intradérmica foi então escolhida para a administração dos MVA aos animais.

Uma vez escolhida a via de imunização que aperfeiçoasse a indução de células T CD8⁺ citotóxicas, os animais foram imunizados de acordo com o protocolo de vacinação descritos na tabela 2. Apesar de bem relatado na literatura, que a imunização heteróloga utilizando MVA como reforço de uma dose inicial de DNA tem um efeito potencializador da indução de células produtoras de IFN γ , em comparação com a vacinação com duas doses de DNA [66], em nossos dados de ELSIPOT ou de citotoxicidade in vivo esse efeito não foi observado quando foram testados os peptídeos CD4 e CD8 específicos de A2. É importante ressaltar que a resposta induzida contra os peptídeos testados poderia avaliar apenas parcialmente a resposta imune e seria interessante avaliar a resposta contra a proteína total. É possível, portanto, que haja resposta imune contra outros epítopos do antígeno A2 que não tenham sido testados.

Protocolos de vacinação com DNA-MVA foram descritos para vários antígenos de *Leishmania*, incluindo LACK e TRYP. Nesses estudos, a resposta imune induzida pelas imunizações foi capaz de gerar proteção contra infecção desafio com *L. infantum* e *L. major*, respectivamente [67, 68].

Em 2005, Dondji e colaboradores descreveram a utilização do MVA-LACK, sendo empregadas duas doses de MVA-LACK, por via intraperitoneal reforço da vacinação por DNA codificador de LACK administrado via intradérmica. Como resultado das imunizações foi induzida alta produção de IFN γ e IL-10 nos animais imunizados com DNA e MVA LACK na maior dose, porém proporcionalmente, a produção de IFN γ foi cerca de 4 vezes maior que a de IL-10. Contudo, não foi encontrada produção significativa de TNF α . O grupo de animais imunizados por este protocolo heterólogo apresentou a maior proteção dos animais, uma vez que houve redução de quase 100x

(10²) no número de parasitas no baço. Essa proteção parecia estar correlacionada com os altos níveis de IFN γ , uma vez que no grupo de animais imunizados apenas com DNA LACK, a produção de IFN γ foi consideravelmente mais baixa e não foi encontrada proteção perante a infecção desafio [68].

Nos esquemas de vacinação com o antígeno TRYP, animais BALB/c foram vacinados com DNA TRYP via subcutânea e após cinco semanas foi administrada uma dose intravenosa de MVA TRYP. O desafio com *L. major* foi feito 2 semanas após as últimas imunizações com promastigotas. Os resultados encontrados para o grupo vacinado com DNA-TRYP e MVA-TRYP foram alta produção de anticorpos e semelhante produção de IFN γ na 2^a e 16^a semanas após o desafio, indicando que a produção dessas citocinas, foi sustentável nesse grupo, diferentemente do encontrado para o grupo de animais imunizados apenas com uma dose de DNA. Essa resposta estava relacionada aos níveis de proteção, uma vez que os animais submetidos ao protocolo heterólogo apresentaram a maior redução da carga parasitária. Contudo, nesse estudo não foi avaliada a importância das células T CD8⁺ no modelo de vacinação proposto [67].

Até o momento, poucos trabalhos descrevem a utilização conjunta dos vírus MVA e adenovírus em protocolos heterólogos, como adjuvantes e vetores vacinais contra a infecção por diferentes patógenos, incluindo as espécies de *Leishmania*. Recentemente, foi publicado um estudo em que foram utilizados esses dois vetores em conjunto, no modelo de infecção por *Mycobacterium avium* [58]. Com isso, nosso trabalho tem o mérito de ser o primeiro a avaliar a utilização desses vírus no modelo de leishmanioses.

Na avaliação da resposta imune celular de uma forma geral, o protocolo de vacinação em que houve maiores níveis de células produtoras de IFN γ e citotoxicidade peptídeo-específica *in vivo*, foi a vacinação com uma dose inicial de AdA2 e reforço com MVAA2. Nesse grupo, os animais apresentaram células produtoras de IFN γ sob estímulo dos dois peptídeos descritos, tanto para células CD4 quanto CD8. Com relação à caracterização da resposta imune, esse foi considerado o melhor protocolo de vacinação, já que foi capaz de induzir a proliferação tanto de células T CD8⁺ como de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ .

Com relação à produção de citocinas de tipo Th2 como IL-4 e IL-10, em nenhum dos grupos testados houve detecção de células capazes de produzi-las mediante estímulo com os peptídeos de A2 (dados não mostrados). Embora IL-4 tenha o papel clássico de promover a diferenciação das células TCD4⁺ em células Th2 e ativar células B para produção de anticorpos neutralizantes e IL-10 de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos, tendo um papel regulatório da resposta imune, a forma com que esses mecanismos influenciam o desenvolvimento da leishmaniose visceral ainda é controversa, principalmente, quando diferentes espécies de *Leishmania* e linhagens de camundongos são utilizadas. Contudo, parece ser evidente, na maioria dos modelos experimentais de leishmaniose visceral, que altos níveis dessas citocinas acarretam desenvolvimento acelerado da doença. Portanto, a indução dessas citocinas, não seria interessante do ponto de vista da geração de uma vacina.

Esses resultados corroboram o que já foi previamente demonstrado, que a imunização com proteína A2 induz a alta produção de IFN γ , mas não é eficaz em estimular a produção de elevada de IL-4 e IL-10, em comparação com outras proteínas também descritas na literatura, como LACK e NH [35, 69]. No entanto, é importante mencionar que seria interessante avaliar a resposta contra a proteína A2 total, pois, apesar de ter sido mostrado que a imunização com a proteína ou o DNA codificador da mesma não induzem alta produção de IL-4 e IL-10, a imunização com vírus poderia induzir a apresentação de epítomos diferentes dos descritos. Isso pode ocorrer, porque os vírus são capazes de induzir a expressão de IFN γ e outras citocinas, que, por sua vez poderia criar um ambiente imunológico totalmente diferente para a apresentação de antígenos. Além disso, essas citocinas podem atuar na expressão de genes codificadores de proteínas que atuam no processamento de antígenos e formação do complexo chamado de imunoproteassoma. Esse processamento diferencial poderia, portanto, levar à apresentação de peptídeos ao sistema imune diferentes dos que foram testados e conferir um padrão de produção de citocinas diferenciado [70, 71].

Uma vez que foram identificados altos níveis de células produtoras de IFN γ específicas para os peptídeos e não foram identificadas células produtoras de IL-4 e IL-10, considera-se que a resposta imune induzida pela vacinação no grupo AdMVAA2 tenha sido do tipo Th1. Esta é uma característica extremamente importante quando se avalia a possibilidade de utilização desse modelo de vacinação contra o desafio com

espécies de *Leishmania*, uma vez que a resposta Th1 é indicativa de proteção e controle da proliferação dos parasitas pelo hospedeiro.

Adicionalmente, em trabalho recente, Darrah e colaboradores descreveram que a proteção contra a infecção por parasitas *L. major* estava relacionada à estimulação específica de células Th1 multifuncionais, capazes de produzir concomitantemente IFN γ , TNF α e IL-2. No trabalho foram testados vários protocolos de vacinação utilizando adenovírus recombinante e CpG, entre outros, e, apesar de alguns deles estimularem alta resposta de células CD4⁺ produtoras apenas de IFN γ , nem sempre altos níveis dessa citocina se relacionava à proteção contra infecção desafio por *L. major*. Porém havia correlação entre os níveis de proteção e a presença de células produtoras das três citocinas. Assim, após as imunizações, apesar de necessária, a produção apenas de IFN γ não seria preditiva de proteção [72]. Esses dados indicam a importância de se realizar uma avaliação mais detalhada das citocinas produzidas nos esquemas de vacinação e de se correlacionar a produção destas com proteção.

Além da resposta T CD4⁺, também foi identificada a indução de células T CD8⁺. As células T CD8⁺ podem agir pela produção de citocinas, como IFN γ e TNF α e/ou por mecanismos citotóxicos [73]. A produção de citocinas tem consequências locais e sistêmicas, enquanto que a atividade citotóxica é direcionada às células infectadas, que estão em contato com as células efectoras. Os dados de citotoxicidade *in vivo* mostram que apenas as células que apresentaram o peptídeo CD8 foram alvo de lise específica, somente no grupo de animais imunizados com adenovírus e MVA. Isso indica que o peptídeo CD4 induz a produção de IFN γ por células TCD4⁺ mas não induz citotoxicidade por células CD8⁺. Ou seja, o peptídeo CD4 não é reconhecido pela molécula CD8. Além disso, as células T CD8⁺ estimuladas pela vacinação poderiam atuar como efectoras não apenas produzindo IFN γ , como também reconhecendo, lisando células específicas e regulando a resposta imune.

Até o presente momento, o papel das células T CD8⁺ na resposta imune contra parasitas parece ser devido à produção de citocinas ativadoras da ação microbicida dos macrófagos, porém, neste estudo, além da produção de IFN γ pelas células T CD8⁺, também foi identificada a indução de células TCD8⁺ com ação citotóxica, responsáveis pela lise específica de células que apresentem peptídeos derivados do antígeno A2 (figura 7 e 9).

O papel das células T CD8⁺ citotóxicas na infecção por *Leishmania* ainda não foi bem caracterizado. Em 2003, Tsagozis e colaboradores demonstraram em estudos *in vitro*, que durante a infecção de macrófagos em cultura por *L. infantum* ocorre estimulação de células T CD8⁺ citotóxicas específicas contra antígenos do parasita. A atividade citotóxica dessas células parece ocorrer através de secreção de perforina e indução de apoptose pela via Fas/FasL [74].

Ainda não se sabe como os antígenos presentes no vacúolo fagocítico deixam esse local para serem processados e apresentados às células T CD8⁺ via MHC de classe I. Foi demonstrado que os antígenos intracelulares de *Leishmania* não seriam processados por macrófagos infectados pelas vias clássicas de processamento de antígeno via MHC classe I, mas seriam apresentados via “cross-presentation”, pelas células dendríticas. Os antígenos secretados e de superfície poderiam ser processados pelas vias dependentes de endossomos, como aquela utilizada para a apresentação de antígenos via MHC classe II [75]. A proteína A2, por ser um antígeno intracelular de *Leishmania* poderia também ser apresentada via “cross-presentation” e talvez a resposta contra essa proteína específica ocorra em momentos mais tardios da infecção.

Em 2005, o mesmo autor realizou testes de citotoxicidade *in vivo*, nos animais C57BL/6, nos quais foram identificadas células T CD8⁺ citotóxicas capazes de lisar células que apresentassem um antígeno CD8 associado às moléculas de MHC I apenas nos animais infectados. No entanto, o papel dessa resposta na redução de carga parasitária ou contenção da infecção ainda permanece sob investigação [76]. Aparentemente, a lise dos macrófagos infectados induzida por células citotóxicas ativadas não inviabilizaria a sobrevivência das *Leishmanias* liberadas [77]. Contudo, a lise das células poderia ser importante no controle da infecção, quando houvesse a produção concomitante de IFN γ , principalmente pelas células CD8, após o reconhecimento específico do antígeno. Assim, o IFN γ , juntamente com o TNF α , atuariam como importantes ativadores dos macrófagos adjacentes às células lisadas, pela a indução de NO, o que proporcionaria a atividade microbicida dessas células, possibilitando a eliminação de grande parte das *leishmanias* liberadas pela lise das células alvo [76].

Ainda com objetivo de desvendar o papel das células T CD8⁺ na infecção por *leishmanias*, Colmenares, et. al. realizaram um experimento, no qual animais nocautes

para o gene de β_2 -microglobulina, em que a resposta de células T CD8⁺ é deficiente, foram utilizados na vacinação com o antígeno P-8. Os animais vacinados não foram capazes de controlar a infecção por *L. amazonensis*. Contudo, de uma forma geral, os animais infectados e vacinados, nocautes para esse gene apresentavam menor número de parasitas e menores lesões [78]. O nível de infecção pode ter sido influenciado por baixos níveis de anticorpos identificados nesses animais, uma vez que os anticorpos parecem ser cruciais para o desenvolvimento de *L. amazonensis* no modelo animal de C57BL/6 [79]. Assim, seria possível que nos primórdios da infecção, os baixos níveis de anticorpos nos animais nocautes teriam contribuído para o menor tamanho das lesões [78].

Em trabalho mais recente, a resposta de células TCD8⁺ pareceu não exercer papel fundamental na proteção contra a infecção por *L. amazonensis*, uma vez que camundongos C57BL/6, vacinados com extrato total de *L. amazonensis*, deficientes em IL-12 e depletados de células T CD8⁺ apresentaram menores lesões (provavelmente devido ao menor infiltrado de linfócitos), apesar da carga parasitária encontrada se assemelhar à observada nos animais não depletados. Além disso, os animais depletados apresentavam baixa dosagem de IFN γ e macrófagos pouco vacuolizados. Contudo, nos animais deficientes em β_2 -microglobulina apresentaram maiores lesões e número de parasitas, comparados aos animais normais, diferentemente do resultado descrito anteriormente por Colmenares e colaboradores, em 2003 [80].

Contudo, camundongos C57BL/6 são animais nos quais a infecção por *L. amazonensis* apresenta uma evolução crônica com controle parcial das lesões cutâneas pelo animal [81]. Neste modelo, é possível que outros agentes da resposta imune estejam atuando, promovendo uma resposta diferente da que ocorre nos animais BALB/c perante a infecção visceral causada por *L. chagasi*, mais susceptíveis à infecção. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que o controle dos parasitas nos animais susceptíveis poderia ser realizado com a participação de outras células, incluindo as células T CD8⁺.

Em 2003, Colmenares e colaboradores também avaliaram o papel das células T CD8⁺ em camundongos C57BL/6 vacinados com o antígeno P-8, na infecção de por *L. amazonensis*, pela expressão de IFN γ e perforina no local de infecção. Esse grupo observou a produção dessas duas moléculas nos animais com resposta protetora no

sítio de infecção, sugerindo que essas células poderiam exercer ação citotóxica nos animais vacinados. Além disso, durante o desenvolvimento das lesões cutâneas nos animais vacinados houve uma mudança da dinâmica da resposta celular envolvida no controle da infecção. No local da infecção, enquanto no início houve predominância de células TCD8⁺ produtoras de IFN γ e perforina as células TCD4⁺, apesar de participarem nos estágios iniciais, seriam cruciais ao final da infecção. Ainda nesse trabalho, o papel da perforina foi avaliado utilizando-se animais deficientes para a produção dessa molécula. Assim, os animais vacinados, deficientes na produção de perforina, foram incapazes de controlar a infecção, apresentando, como consequência, maiores lesões e maior número de parasitas. Dessa forma, o desenvolvimento da resposta efetora, pela produção de perforina e IFN γ pelas células T CD8⁺ são claramente requeridos na resposta protetora contra *L. amazonensis* nos animais vacinados. Contudo, nos animais nocautes infectados não vacinados, não foi encontrada maior susceptibilidade à infecção [78].

Em 2000, Gurunathan e colaboradores verificaram que em animais da linhagem BALB/c, vacinados com o DNA antígeno LACK, mas não nos animais imunizados com a proteína LACK, a proteção era abolida e o número de células T CD4⁺ era diminuído quando os animais eram tratados com anticorpo anti-CD8 *in vivo*, no momento da infecção por *L. major*. A depleção das células T CD8⁺, também no momento da vacinação, limitou a geração de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ . Assim, os resultados do trabalho sugerem que, em adição ao papel efetor das células T CD8⁺, estas também poderiam apresentar papel na imunoregulação, mantendo a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ antes ou após a infecção. Em relação aos dados clínicos, nos animais depletados de células CD8, o tamanho das lesões estava extremamente aumentado em comparação ao grupo vacinado não depletado. Apesar de não terem avaliado o papel das células T CD8⁺ citotóxicas, os experimentos desse grupo foram fundamentais em demonstrar que as células T CD8⁺ podem exercer funções tanto efectoras, como reguladoras da resposta imune mediada pelas células T CD4⁺ nos camundongos BALB/c [82].

Resende et al, 2008 verificou que, animais imunizados com única dose de AdA2, previamente depletados seletivamente com anti-CD8 tiveram apenas a resposta contra o epítipo CD8 da proteína A2 abolida, enquanto que os animais depletados

seletivamente com anti-CD4 tiveram as respostas a ambos os peptídeos CD8 e CD4 da proteína A2 diminuídas. Isso corrobora o fato de que a resposta das células T CD8⁺ seria dependente das células T CD4⁺ [34].

A vacina contra leishmaniose visceral canina atualmente encontrada no mercado, Leishmune[®], licenciada pelo Ministério da Agricultura, desde junho de 2003, é composta pelo antígeno FML (Fucose-Manose Ligante) de *Leishmania donovani* e vem sendo utilizada como medida profilática. Essa formulação atua de forma a bloquear a transmissão da leishmaniose visceral canina para o flebotômíneo, dificultando, e, muitas vezes, impedindo que o ciclo de vida das leishmanias se complete. A segunda vacina disponível no mercado, Leishvaccine é utilizada atualmente em associação com fármacos como forma de tratamento para a leishmaniose, é composta por uma preparação de antígeno total de leishmania e é administrada com o adjuvante BGC, proposta pelo Dr. Mayrink nas décadas de 1980 e 1990 [83]. Ambas as formulações têm eficácia comprovada e, apesar de apresentarem mecanismos de atuação muito diferente no sistema imune, apresentam a característica em comum de estimular monócitos e linfócitos T CD8⁺ [84]. A função dos linfócitos T CD8⁺ ainda está sob investigação.

Esses dados, tomados em conjunto, indicam que o papel das células T CD8⁺ na proteção e contenção do desenvolvimento da infecção pelas espécies de *Leishmania* ainda é controverso. Vários fatores podem influenciar na avaliação do papel dessas células, em animais vacinados, como os regimes de imunização estudados, o antígeno utilizado e o modelo de infecção adotado, levando em consideração tanto o hospedeiro animal quanto a espécie de *Leishmania* utilizados.

Em 2005, o grupo liderado pelas Dras. Clarissa Palatnik-de-Sousa e Maria Cecília Luvizotto, responsáveis pela formulação vacinal existente hoje em comercialização, publicou um trabalho mostrando que os cães imunizados com a vacina Leishmune[®] e desafiados com *L. chagasi* apresentaram, após onze meses de acompanhamento, completa ausência tanto de sinais clínicos da doença como também ausência de parasitas na pele, no sangue e linfonodos, detectados por PCR. Neste mesmo trabalho, o grupo mostrou que 50% dos cães infectados apresentaram sorologia positiva para FML assim como 100% dos cães vacinados [85].

Já em 2006, o mesmo grupo de pesquisa publicou um trabalho mostrando que a porção Fab anti FML, purificada de anticorpos IgG do soro de animais vacinados com

Leishmune[®], impede a ligação de *L. chagasi* e *L. donovani* ao epitélio intestinal do flebotomíneo transmissor *Lutzomyia longipalpis*. Nesse estudo foi observado ainda, que flebotomíneos que realizaram repasto sanguíneo contendo soro de animais vacinados apresentaram 79,30% de proteção contra o desafio por *L. chagasi* [86]. Tomados em conjunto, esses trabalhos demonstram que a vacinação com Leishmune[®] seria capaz de bloquear a transmissão da leishmaniose, impedindo o fechamento do ciclo de vida das leishmanias no vetor invertebrado.

A distinção sorológica entre os animais vacinados com Leishmune[®] e os animais infectados é o ponto fraco da vacina. Como forma de minimizar esse problema, novas metodologias capazes de realizar a distinção dos animais vacinados e infectados foram buscadas. Em 2007, foi publicado um trabalho coordenado pelo Dr. Martins-Filho em que os animais vacinados com Leishmune[®] poderiam ser diferenciados dos animais infectados por citometria de fluxo apresentando 100% de especificidade para ambos IgG e IgG2 e 97% e 93% de sensibilidade, respectivamente [87]. Apesar de não ser muito dispendiosa após a obtenção do aparelho de FACS, para ser utilizada como exame de rotina, a citometria de fluxo é uma técnica muito onerosa, uma vez que o aparelho para realizar a aquisição e análises das amostras é financeiramente inacessível para a prefeitura da maioria das cidades brasileiras.

Pensando nesse problema, seria importante desenvolver uma vacina que fosse ao mesmo tempo eficiente em controlar os níveis de infecção no hospedeiro mamífero e permitir a distinção sorológica em relação ao animal infectado. Assim, neste trabalho foi avaliada a resposta imune humoral contra SLA das formas promastigota e amastigota para verificar a distinção sorológica entre os animais vacinados e infectados.

Anticorpos anti-A2 foram detectados em soro de pacientes com leishmaniose visceral crônica causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. donovani* [32] e por espécies do novo mundo [61]. A imunização com a proteína recombinante A2 também induziu produção de anticorpos em camundongos BALB/c, quando se utilizou alúmen, um potente indutor de resposta humoral, como adjuvante [35], contudo a imunização de camundongos com vírus recombinantes expressando A2 ou com DNA codificador de A2 não se mostraram eficientes na indução da resposta humoral, uma vez que estes são potentes estimuladores de resposta celular. Esse é um aspecto interessante, considerando-se uma formulação vacinal contra leishmaniose, uma vez que foi observado que a produção de altos níveis de anticorpos contra *Leishmania* não é

indicativo de proteção, e, pelo contrário, poderia conduzir à exacerbação da doença [88].

Com relação à resposta imune humoral nos animais vacinados neste estudo, nenhum dos grupos vacinados foi considerado positivo para a produção de anticorpos utilizando o modelo de diagnóstico atualmente utilizado para a detecção de cães soropositivos para leishmaniose, em que é utilizado SLA das formas promastigotas. Em quaisquer dos protocolos testados, os animais vacinados foram facilmente diferenciados pela sorologia dos animais infectados por *L. chagasi*. Ou seja, a imunização com vírus recombinantes expressando A2, ou mesmo DNA, não é capaz de induzir anticorpos numa concentração detectável pelo ELISA de SLA de promastigota. Isso poderia ser explicado em parte pelas características dos adjuvantes utilizados nas imunizações, capazes de estimular de grande forma a resposta celular e parte pelas características do antígeno A2 em si, já que se trata de uma proteína intracelular de *Leishmania*. Também se deve levar em consideração o fato da proteína A2 representar apenas uma pequena fração do antígeno total de amastigota. Dessa forma, pode ser que o aparecimento de anticorpos anti-A2 fosse mais evidente decorrido maior tempo de infecção. De maneira muito importante, esse aspecto tem implicações valiosas para o diagnóstico da infecção em animais vacinados, uma vez que o diagnóstico sorológico utilizando SLA das formas promastigotas é o mais amplamente utilizado nos centros de referência para evidenciar a infecção dos cães domésticos e demais hospedeiros da doença.

7 Conclusões e Perspectivas do trabalho:

Pelos dados apresentados nesse trabalho pode-se concluir que o MVA recombinante obtido foi capaz de expressar a proteína A2 tanto *in vitro*, como *in vivo*, em animais submetidos à vacinação.

O protocolo de imunização dose-reforço com AdA2, seguido de MVAA2 foi, entre os protocolos testados, o mais eficiente em induzir uma resposta imune celular do tipo Th1, caracterizada pela alta produção de IFN γ , e baixas produções de IL-10 e IL-4 contra os peptídeos CD4-2 e CD8 de A2, previamente mapeados, além de gerar altos níveis de citotoxicidade contra células que apresentem o peptídeo CD8 e baixos níveis de anticorpos anti-A2.

Nos demais esquema de imunização não foi possível identificar a indução de células TCD4⁺ produtoras de IL-4, IL-10 ou IFN γ e células TCD8⁺ produtoras de IFN γ ou com ação citotóxica específica para os peptídeos de A2 testados.

A ausência de reatividade do soro de animais vacinados com A2 com o extrato total de formas promastigotas é uma característica relevante, considerando o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral canina.

Como perspectiva desse trabalho considera-se que seria importante realizar a caracterização da resposta imune celular contra antígeno total de *Leishmania* e contra a proteína recombinante A2 e não apenas aos peptídeos CD4 e CD8 mapeados, para identificar o nível de resposta contra esses antígenos após a vacinação. Além disso, é necessária melhor caracterização da resposta imune celular de forma geral, buscando células produtoras de três citocinas IL-2, IFN γ e TNF α , uma vez ter sido demonstrado que tais células podem estar relacionadas a maiores níveis de proteção contra a infecção no modelo de infecção por *L. major*. Seria também de grande importância realizar experimentos de desafio contra a infecção por *L. chagasi* para avaliar tanto a resposta imune nos grupos vacinados, após o desafio como os níveis de proteção induzidos nos diferentes esquemas de vacinação testados.

8 Referências Bibliográficas:

- [1] Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug;2(8):494-501.
- [2] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.
- [3] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):305-18.
- [4] Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007 Jul-Sep;20(3):435-45.
- [5] Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002 Sep;9(5):951-8.
- [6] Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*. 2006 Apr;7(4):294-305.
- [7] Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, et al. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*. 2006;7:52.
- [8] van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 12;103(37):13837-42.
- [9] Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2006 May-Jun;48(3):151-6.
- [10] Sundar S, Mehta H, Chhabra A, Singh V, Chauhan V, Desjeux P, et al. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 1;42(5):608-13.
- [11] Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine*. 2001 Apr 30;19(23-24):3169-78.
- [12] Perez-Jimenez E, Kochan G, Gherardi MM, Esteban M. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect*. 2006 Mar;8(3):810-22.
- [13] McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev*. 2004 Oct;201:206-24.
- [14] Barbosa Junior AA, Andrade ZA, Reed SG. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Braz J Med Biol Res*. 1987;20(1):63-72.
- [15] Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today*. 2000 Feb;21(2):73-8.
- [16] Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994 Mar;62(3):1058-63.
- [17] Carrion J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2006 May;28(5):173-83.
- [18] Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun*. 2006 Jul;74(7):4370-4.

- [19] Murray HW, Jungbluth A, Ritter E, Montelibano C, Marino MW. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infect Immun*. 2000 Nov;68(11):6289-93.
- [20] Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial pathogenesis*. 2005 Apr;38(4):147-60.
- [21] Wilson ME, Recker TJ, Rodriguez NE, Young BM, Burnell KK, Streit JA, et al. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *Eur J Immunol*. 2002 Dec;32(12):3556-65.
- [22] Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol*. 2002 Oct;32(10):2923-33.
- [23] Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. *Int Immunol*. 1993 Sep;5(9):1119-28.
- [24] Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):2848-56.
- [25] Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6284-93.
- [26] Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004 Jun;119(6):238-58.
- [27] Kubar J, Fragaki K. Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis*. 2005 Feb;5(2):107-14.
- [28] Charest H, Matlashewski G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol*. 1994 May;14(5):2975-84.
- [29] Zhang WW, Charest H, Ghedin E, Matlashewski G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Jun;78(1-2):79-90.
- [30] Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 5;94(16):8807-11.
- [31] Zhang WW, Mendez S, Ghosh A, Myler P, Ivens A, Clos J, et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem*. 2003 Sep 12;278(37):35508-15.
- [32] Ghedin E, Zhang WW, Charest H, Sundar S, Kenney RT, Matlashewski G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997 Sep;4(5):530-5.
- [33] Martins DR, Jeronimo SM, Donelson JE, Wilson ME. *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6940-8.
- [34] Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CD, Verly RM, et al. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine*. 2008 Jun 24.
- [35] Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, et al. 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*. 2003 Jul;71(7):3988-94.

- [36] Dunachie SJ, Walther M, Vuola JM, Webster DP, Keating SM, Berthoud T, et al. A clinical trial of prime-boost immunisation with the candidate malaria vaccines RTS,S/AS02A and MVA-CS. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2850-9.
- [37] Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol*. 2005 Jul 15;175(2):633-9.
- [38] Ramirez JC, Gherardi MM, Esteban M. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol*. 2000 Jan;74(2):923-33.
- [39] Drexler I, Staib C, Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol*. 2004 Dec;15(6):506-12.
- [40] Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber HC, Schafer H, Holzner A. [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946). 1974 Nov 22;99(47):2386-92.
- [41] Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991 May;72 (Pt 5):1031-8.
- [42] Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodriguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, et al. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *Journal of virology*. 2003 Oct;77(19):10606-22.
- [43] Hodge JW, Poole DJ, Aarts WM, Gomez Yafal A, Gritz L, Schlom J. Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7942-9.
- [44] Gilbert SC, Moorthy VS, Andrews L, Pathan AA, McConkey SJ, Vuola JM, et al. Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*. 2006 May 22;24(21):4554-61.
- [45] McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AV. Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):681-6.
- [46] Zhang X, Cassis-Ghavami F, Eller M, Currier J, Slike BM, Chen X, et al. Direct comparison of antigen production and induction of apoptosis by canarypox virus- and modified vaccinia virus ankara-human immunodeficiency virus vaccine vectors. *J Virol*. 2007 Jul;81(13):7022-33.
- [47] Palmowski MJ, Choi EM, Hermans IF, Gilbert SC, Chen JL, Gileadi U, et al. Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4391-8.
- [48] McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):729-35.
- [49] Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 27;101(17):6641-6.
- [50] Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, et al. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):470-7.
- [51] Demberg T, Florese RH, Heath MJ, Larsen K, Kalisz I, Kalyanaraman VS, et al. A replication-competent adenovirus-human immunodeficiency virus (Ad-HIV) tat and Ad-HIV env

- priming/Tat and envelope protein boosting regimen elicits enhanced protective efficacy against simian/human immunodeficiency virus SHIV89.6P challenge in rhesus macaques. *J Virol*. 2007 Apr;81(7):3414-27.
- [52] Vos A, Neubert A, Pommerening E, Muller T, Dohner L, Neubert L, et al. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabies by different routes of administration. *J Gen Virol*. 2001 Sep;82(Pt 9):2191-7.
- [53] Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, Williamson MM, Hodgson AL, Johnson MA. Oral and sub-cutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 gene. *Arch Virol*. 2001;146(9):1787-93.
- [54] Bruna-Romero O, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hafalla JC, Tsuji M, Nussenzweig RS. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11491-6.
- [55] Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Penido ML, Gazzinelli RT. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther*. 2006 Apr;17(4):415-26.
- [56] Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *The Journal of general virology*. 2000 Nov;81(Pt 11):2573-604.
- [57] Babiuk LA, Tikoo SK. Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J Biotechnol*. 2000 Sep 29;83(1-2):105-13.
- [58] Bull TJ, Gilbert SC, Sridhar S, Linedale R, Dierkes N, Sidi-Boumedine K, et al. A Novel Multi-Antigen Virally Vectored Vaccine against Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis. *PLoS ONE*. 2007;2(11):e1229.
- [59] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977 Jul;36(1):59-74.
- [60] Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J*. 2002 Jun;16(8):869-71.
- [61] Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 Aug;43(4):289-95.
- [62] Carvalho LH, Hafalla JC, Zavala F. ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8⁺ T cell responses. *J Immunol Methods*. 2001 Jun 1;252(1-2):207-18.
- [63] Anderson RJ, Hannan CM, Gilbert SC, Laidlaw SM, Sheu EG, Kortzen S, et al. Enhanced CD8⁺ T cell immune responses and protection elicited against Plasmodium berghei malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):3094-100.
- [64] Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8⁺ T cell responses. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):533-43.
- [65] Earl PL, Americo JL, Wyatt LS, Eller LA, Montefiori DC, Byrum R, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara provides durable protection against disease caused by an immunodeficiency virus as well as long-term immunity to an orthopoxvirus in a non-human primate. *Virology*. 2007 Sep 15;366(1):84-97.
- [66] Dunachie SJ, Walther M, Epstein JE, Keating S, Berthoud T, Andrews L, et al. A DNA prime-modified vaccinia virus ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naïve adults against Plasmodium falciparum sporozoite challenge. *Infect Immun*. 2006 Oct;74(10):5933-42.
- [67] Stober CB, Lange UG, Roberts MT, Alcamí A, Blackwell JM. Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing trypan redoxin peroxidase

promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c Mice. *Infect Immun.* 2007 Feb;75(2):852-60.

[68] Dondji B, Perez-Jimenez E, Goldsmith-Pestana K, Esteban M, McMahon-Pratt D. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):5286-9.

[69] Zanin FH, Coelho EA, Tavares CA, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, Rezende SA, et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1070-7.

[70] Kloetzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nature immunology.* 2004 Jul;5(7):661-9.

[71] Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H, et al. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *The Journal of clinical investigation.* 2004 Jul;114(2):250-9.

[72] Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):843-50.

[73] Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology.* 2003 Sep;4(9):835-42.

[74] Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2003 Nov-Dec;25(11-12):569-79.

[75] Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007 Dec;29(12):671-8.

[76] Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. *Parasitol Int.* 2005 Jun;54(2):139-46.

[77] Smith LE, Rodrigues M, Russell DG. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J Exp Med.* 1991 Sep 1;174(3):499-505.

[78] Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3172-82.

[79] Christianson GJ, Brooks W, Vekasi S, Manolfi EA, Niles J, Roopenian SL, et al. Beta 2-microglobulin-deficient mice are protected from hypergammaglobulinemia and have defective antibody responses because of increased IgG catabolism. *J Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4781-92.

[80] Hernandez Sanabria MX, Afonso LC, Golgher D, Tafuri WL, Vieira LQ. CD8+ T cells are not required for vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* in IL-12/23P40(-/-) C57BL/6 mice. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1124-34.

[81] Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 1993 Jul;61(7):2952-9.

[82] Gurunathan S, Stobie L, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Iwasaki A, et al. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol.* 2000 Jul 15;165(2):915-24.

[83] Mayrink W, Genaro O, Dias M, da Costa CA, Michalick MS, Melo MN, et al. Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1990 Jan-Feb;32(1):67-9.

[84] Araujo MS, de Andrade RA, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Sathler-Avelar R, et al. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate

phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008 Apr 24;26(18):2211-24.

[85] Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 2005 Sep 23;23(40):4805-10.

[86] Saraiva EM, de Figueiredo Barbosa A, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*. 2006 Mar 20;24(13):2423-31.

[87] de Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araujo MS, et al. Clinical value of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2007 Mar 15;116(1-2):85-97.

[88] Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):747-54.

WHO (2004): <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>

WHO (2007): <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>