

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c
IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE A2
DE *Leishmania chagasi***

Márcia Mariza Gomes Jusi

Bióloga

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c
IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE A2
DE *Leishmania chagasi***

Márcia Mariza Gomes Jusi

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutorado em Microbiologia Agropecuária.

2015

M499a Jusi, Márcia Mariza Gomes
Resposta Imune de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 de *Leishmania chagasi*. / Márcia Mariza Gomes Jusi. -- Jaboticabal, 2015
xix, 125p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Rosangela Zacarias Machado

Banca examinadora: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, Hiro Goto, Antonio Carlos Alessi, Pamela Rodrigues Reina Moreira.

Bibliografia

1. *Leishmania chagasi*. 2. A2. 3. BALB/c. 4. Resposta imune celular. 5. qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MÁRCIA MARIZA GOMES JUSI – Nascida na cidade de São João da Boa Vista, em 30 de maio de 1984. É bióloga, formada pela Universidade Estadual Paulista – FCAV-UNESP, câmpus de Jaboticabal-SP, em 2008. Durante o curso de graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 2005 a 2006, na área de Controle Biológico, bolsista do Programa de Apoio ao Estudante – Pró-Reitoria de Extensão Universitária e Assuntos Comunitários (PAE-PROEX) – Bolsa de Apoio Acadêmico I, durante o período de 2006 a 2007, na área de Imunologia. Novamente bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP de 2007 a 2008, na área de Imunoparasitologia e bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa do CNPq, durante o período de 2008 a 2009. Inicializou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, área de imunoparasitologia, na mesma faculdade (FCAV-UNESP), sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, e o finalizou em 2011. Neste mesmo ano, ingressou no curso de doutorado pelo mesmo Programa na FCAV-UNESP, sob orientação da mesma professora.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

DEDICATÓRIA

A Deus,

E, aos meus pais, Fernando Jusi e Mariza Gomes Jusi, pelo apoio, amor imensurável, exemplo de honestidade e caráter. Vocês foram e serão sempre a minha base. Fica registrado aqui, meu amor maior do mundo, meu imenso respeito e admiração para todo o sempre, por vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir realizar mais esse sonho.

Aos meus pais, por toda dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, Fernando César, André Luíz e Marco Aurélio e minhas cunhadas Raquel e Renata.

À todos os meus queridos sobrinhos que tanto amo! São minha alegria na vida!

À todos os meus familiares que de alguma forma me incentivaram.

À professora Rosangela, pela credibilidade, por todo aprendizado, paciência e solidariedade. E mais do que isso, pela amizade e carinho com o qual sempre fui tratada. Saiba que tenho enorme respeito e carinho!

À professora Hiro Goto pela gentileza durante suas considerações na banca, por sua disponibilidade e considerável contribuição na correção desta tese.

À professora Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira que além de ser professora tenho o privilégio de chamá-la de amiga. Tive o privilégio de acompanhá-la durante seu doutorado, período no qual aprendi muito do que sei hoje! Muito obrigada por sua ajuda no início desta tese para colheita de material dos cães e por sempre estar disposta a me auxiliar quando preciso!

À pós-doc Pamela Rodrigues Reina Moreira por me ensinar imuno-histoquímica e por me auxiliar nas padronizações da mesma. Ajuda fundamental que finalizou neste trabalho tão bonito! E mais do que isso, ganhei uma amiga maravilhosa! Registro minha admiração pela pessoa sempre gentil, alegre e de bem com a vida!

Ao professor recém-aposentado Antonio Carlos Alessi que aceitou participar da banca e nos prestigiar com todo seu conhecimento. Obrigada pela gentileza nas considerações da tese.

À professora Rose por nos permitir utilizar seu laboratório e por nos auxiliar na leitura das lâminas.

Ao professor Marcos Rogério André por seu auxílio durante toda a execução do projeto desde as inoculações até a técnica de PCR em Tempo Real. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e amizade desde sempre!

À professora Lúcia Helena Faccioli e sua técnica Fabiana Rosseto Moraes por nos abrir as portas do laboratório e nos auxiliar na execução da técnica de citometria de fluxo.

Ao Chefe da Seção de Apoio Técnico do Serviço de Biotério da CCRP-USP de Ribeirão Preto, Rinaldo Bueno Ferreira, pela doação dos camundongos BALB/c utilizados neste trabalho. Mas acima de tudo pela gentileza com que nos atendia. Muito obrigada!

À Professora Wilma Starke-Buzetti e seu aluno Diogo Tiago por nos auxiliar no início desta tese com as colheitas de material em Ilha Solteira. Meu muito obrigada por sempre me receberem tão bem!

A Carla Roberta Freschi e Rafaela Beraldo (CBPV) pelas amizades que eu tanto considero, por dividir todas as alegrias, risadas e, inevitavelmente, compartilhar as angústias que acontecem no ambiente de trabalho. As palavras são poucas pra expressar meu carinho por vocês! Vocês são a família que escolhi e que fazem o dia-a-dia no laboratório um prazer!

Ao grupo do laboratório que tenho o prazer de compartilhar diariamente a companhia e que tantas vezes também me auxiliaram: Keyla, Luís, Paulo, Otávio, Seu Carlos Matos, Mayra, Renan, Simone, Bia, Mayara e Arvelino.

Ao amigo Kétherson que tive o prazer de conhecer aqui em Jaboticabal e que tantas vezes me auxiliou nas discussões deste projeto e, principalmente, por me auxiliar na colheita dos tímveis linfonodos! Uma pessoa sempre disposta a ajudar! E, claro, por me apresentar uma típica comida mineira! Meu muito obrigada!

Às minhas amigas que tenho a mais profunda estima. Acredito que a grande maioria sabe a importância que tem na minha vida e como as considero minha família em Jaboticabal, mesmo àquelas que estão à distância: Letícia, Fernanda, Margoto, Analuê (Valita), Cintia (Foguinho), Aline (Kokotinha). Nossa amizade é atemporal!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
I. ELISA-teste – Detecção de anticorpos em soros de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	16
I.1.1. Origem das amostras de soros de cães infectados naturalmente por <i>L. chagasi</i>	16
I.1.2. Preparação do antígeno total solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	16
I.1.3. Elisa-teste na Detecção de Anticorpos nos soros de cães.....	17
I.1.4. Detecção de anticorpos anti-A2-L nos soros de cães.....	18
II. Protocolos de imunização, infecção, eutanásia e colheita dos órgãos dos camundongos.....	19
II.1.1. Camundongos.....	19
II.1.2. Protocolo de Imunização dos grupos (2, 3 e 4).....	20
II.1.3. Infecção dos grupos G1 e G3 e eutanásia.....	20
II.1.4. Colheita e preparação de material (baço e linfonodo) para análises de Expressão de RNA, Histopatologia, Imuno-histoquímica, Imunofluorescência Indireta em Tecidos, ELISA-teste para dosagem de citocinas e Citometria de Fluxo.....	21
III. RIFI e ELISA das amostras de soros dos camundongos.....	23
III.1.1. Obtenção de soro para detecção de anticorpos anti- <i>L. chagasi</i> e anti-A2.....	23

III.1.2. Detecção de anticorpos anti-IgG, IgG1 e IgG2 de <i>Leishmania chagasi</i> nos soros de camundongos pelo ELISA-teste.....	23
III.1.3. Detecção de anticorpos anti- A2-L nos soros de camundongos pelo ELISA-teste.....	24
III.1.4. RIFI para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp.....	25
III.1.4.1. Cultivo do antígeno.....	25
III.1.4.2. Descrição da RIFI.....	26
IV. ELISA de citocina dos sobrenadantes de células dos camundongos.....	27
IV.1.1. Preparo de células esplênicas e de linfonodos para ELISA de citocina.....	27
IV.1.2. Estímulo de células esplênicas e de linfonodos <i>in vitro</i> para ELISA de citocinas.....	27
IV.1.3. Dosagem de citocinas pelo ELISA.....	28
V. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em células de baço e linfonodos de camundongos por Citometria de Fluxo.....	30
V.1.1. Determinação das subpopulações de linfócitos T nas células esplênicas e nos linfonodos poplíteos pela citometria de fluxo.....	30
V.1.2. Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	31
VI. Análise Histopatológica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos.....	32
VI.1.1. Análise Histopatológica.....	32
VII. Análise imuno-histoquímica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos.....	33
VII.1.1. Análise Imuno-histoquímica.....	33
VII.1.2. Análise Estatística.....	35
VIII. Avaliação da expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 pela PCR em Tempo Real.....	36
VIII.1.1. Extração de RNA total.....	36
VIII.1.2. RT-PCR (Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase).....	36
VIII.1.3. Produção de plasmídeos para utilização na técnica de PCR em Tempo Real.....	37

VIII.1.4. Amplificação dos fragmentos de DNA a partir dos cDNAs pela PCR convencional.....	37
VIII.1.5. Purificação do fragmento gênico amplificado por PCR.....	39
VIII.1.6. Quantificação do fragmento purificado.....	40
VIII.1.7. Vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	40
VIII.1.8. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM-T Easy....	41
VIII.1.9. Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> One Shot Match 1TM T1R	42
VIII.1.10. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina).....	42
VIII.1.11. Análise das similaridades de sequências obtidas pelo BLAST.....	44
VIII.1.12. Construção de Curvas-padrão para a PCR em Tempo Real.....	44
VIII.1.13. PCR em Tempo Real.....	44
VIII.1.14. Análise Estatística.....	45
IX. Carga Parasitária de <i>L. chagasi</i> nas amostras de tecido dos camundongos.....	46
IX.1.1. Extração de DNA a partir de baço de camundongos para detecção de infecção.....	46
IX.1.2. Amplificação do DNA de <i>L. chagasi</i> pela PCR convencional.....	46
IX.1.3. Amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR em Tempo Real.....	47
IX.1.4. Análise Estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	49
I. ELISA-teste – Detecção de anticorpos em soros de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	49
I.2.1. Elisa-teste na detecção de anticorpos anti- <i>L. chagasi</i> e anti- A2-L nos soros dos cães.....	49
III. RIFI e ELISA das amostras de soros dos camundongos.....	50
III.2.1. Elisa-teste utilizando o antígeno solúvel total de <i>L. chagasi</i> como antígeno na Detecção de Anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo.....	50

III.2.2. Elisa-teste utilizando a proteína recombinante A2-L como antígeno na Detecção de Anticorpos.....	52
III.2.3. RIFI para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp.....	54
IV. ELISA de citocina dos sobrenadantes de células dos camundongos.....	56
IV.2.1. Dosagem de citocinas pelo ELISA.....	56
V. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em células de baço e linfonodos de camundongos por Citometria de Fluxo.....	61
V.2.1. Determinação das subpopulações de linfócitos T nas células esplênicas e nos linfonodos poplíteos.....	61
VI. Análise Histopatológica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos.....	64
VI.2.1. Análise Microscópica do Grupo 1.....	64
VI.2.2. Análise Microscópica do Grupo 2.....	65
VI.2.3. Análise Microscópica do Grupo 3.....	65
VI.2.4. Análise Microscópica do Grupo 4.....	66
VII. Análise imuno-histoquímica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos.....	71
VII.2.1. Análise Imuno-histoquímica.....	71
VIII. Avaliação da expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 pela PCR em Tempo Real.....	82
VIII.2.1. Resultados da Clonagem.....	82
VIII.2.2. Construção das Curvas-Padrão.....	83
VIII.2.3. Quantificação relativa da expressão das citocinas no Baço.....	85
VIII.2.4. Quantificação relativa da expressão das citocinas no Linfonodo.....	87
IX. Carga Parasitária de <i>L. chagasi</i> nas amostras de tecido dos camundongos.....	89
IX.2.1. Resultados da PCR para tecidos dos grupos G1 e G3 pela PCR convencional e PCR em Tempo Real.....	89
6. Discussão.....	91
7. Conclusões.....	100
8. Referências.....	101

7. ANEXO 1.....	121
-----------------	-----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*. (1) Macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor, durante seu repasto sanguíneo; (2) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas e, posteriormente, (3) em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e (4) são transmitidas após sua picada na derme do hospedeiro; (5) ocorre, então, a fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (6) no interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e (7) iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. (8) Os macrófagos infectados são lisados, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células (*Fonte: adaptado de Handman, 2001*).....6
- Figura 2 – Representação esquemática para seleção da população de células de interesse de linfonodo do grupo G2).....31
- Figura 3 – Captura Digital de Imagem. Imagem capturada com a utilização do programa Image Pro Plus versão 4.5 e análise da seção histológica (imunohistoquímica anti-iNOS, 40X).....35
- Figura 4 – Mapa físico do vetor de clonagem em *E. coli* pGEM-T Easy (Promega).....41
- Figura 5 – Média dos níveis de anticorpos específicos para antígeno solúvel total (AST) de *Leishmania* sp. (valores em Densidades Ópticas – DO) em soro de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculado com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Os resultados são os valores da média de cada grupo \pm Desvio Padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes. O ponto tracejado em vermelho representa o ponto de corte de cada IgG (IgG = 0,228; IgG1 = 0,279 e IgG2a = 0,282).....52
- Figura 6 – Média dos níveis de anticorpos específicos para a proteína recombinante A2-L (valores em Densidades Ópticas – DO) em soro de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculado com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Os resultados são os valores da média de cada grupo \pm Desvio Padrão. O ponto tracejado em vermelho representa o ponto de corte de cada IgG (IgG = 0,218; IgG1 = 0,230 e IgG2a = 0,230).....54
- Figura 7 – Reação de imunofluorescência indireta das amostras de soro dos camundongos em lâminas contendo formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.....55

Figura 8 – Percentual de células CD4⁺ em relação à população de linfócitos T (CD3⁺) existentes no baço e linfonodo de cada grupo de camundongos BALB/c (A) e percentual da Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) dos receptores CD4⁺ na superfície das células (B). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p>0,05). Grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).....62

Figura 9 – Percentual de células CD8⁺ em relação à população de linfócitos T (CD3⁺) existentes no baço e linfonodo de cada grupo de camundongos BALB/c (A) e e percentual da Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) dos receptores CD8⁺ na superfície das células (B). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p>0,05). Grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).....63

Figura 10 – Fotomicrografias de baço de camundongo BALB/c dos grupos G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), respectivamente. (A) e (B) Observar a acentuada reatividade linfoide presente no tecido do baço (Objetiva 20X). Hematoxilina e Eosina.....67

Figura 11 – Fotomicrografias de baço e linfonodo de camundongo BALB/c do grupo G4 (animais do grupo controle). (A) Observar moderada reatividade linfoide no tecido do baço (Obj. 20X). (B) Observar a presença de macrófagos reativos (em destaque) no tecido do linfonodo (Obj. 40X). Hematoxilina e Eosina.....68

Figura 12 – Frequência infiltrado inflamatório no baço dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para linfócitos, macrófagos e plasmócitos69

Figura 13 – Frequência infiltrado inflamatório no linfonodo dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para linfócitos.....69

Figura 14 – Frequência infiltrado inflamatório no baço dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para macrófagos e plasmócitos.....70

Figura 15 – Porcentagem de células imunomarcadas para células expressando iNOS, MHC e MHC II, em tecidos de baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).....72

Figura 16 – Porcentagem de células imunomarcadas para CD8⁺, CD4⁺, macrófagos e linfócitos B em tecidos de baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).....74

Figura 17 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando MHCI em baço de animal do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e no baço de animal do grupo G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de células expressando MHCI em região da polpa vermelha e da polpa branca do baço (*) e no detalhe notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 20x). (B) Observar a imunomarcção de MHCI na região de polpa vermelha do baço (*) e no detalhe notar a imunomarcção em membrana celular. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 20x). Notar a diferença de marcação entre os grupos G3 e G1 para o mesmo órgão.....75

Figura 18 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células T expressando CD8⁺ no baço e linfonodo poplíteo de animais do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha. (B) Observar a imunomarcção de células T na região medular do linfonodo. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....76

Figura 19 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando iNOS no baço de animal do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e no linfonodo poplíteo de animal do grupo G1 (inoculados com promastigotas de

L. chagasi). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha. (B) Observar a imunomarcção de células também na região da polpa vermelha do baço. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....77

Figura 20 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para Macrófagos com o anticorpo anti-MAC387 em baço e linfonodo dos animais dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle). (A) Observar a imunomarcção de macrófagos na polpa vermelha do baço e no detalhe notar a imunomarcção em macrófagos. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de macrófagos na região da medular do linfonodo e no detalhe notar a imunomarcção em macrófagos. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....78

Figura 21 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando MHCII em baço e linfonodo dos animais do grupo G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de células expressando MHCII em região da polpa vermelha do baço e no detalhe notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de MHCII nas regiões de medular e cortical do linfonodo e no detalhe notar a imunomarcção em membrana celular. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....79

Figura 22 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células T expressando CD4⁺ no baço de animais dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha. (B) Observar a imunomarcção de células T na região da polpa vermelha. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....80

Figura 23 – Fotomicrografia de imunomarcção positiva para linfócitos B em baço dos animais dos grupos G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de linfócitos B em região da polpa vermelha do baço e no detalhe notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de linfócitos B na região de polpa vermelha mais intensa do que a observada no mesmo órgão do grupo G2. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x).....81

Figura 24 – Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos específicos para as citocinas e os genes endógenos. Linha 1: padrão 100pb (Fermentas®). Linha 2: Clone recombinante referente ao gene endógeno β -actina (148 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 3: Clone recombinante referente ao gene endógeno GAPDH (236 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 4: Clone recombinante referente ao gene endógeno IFN- γ (92 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 5: Clone recombinante referente à IL-2 (141 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 6: Clone recombinante referente à TNF- α (175 pares de base) no vetor pGEM T-Easy.....82

Figura 25 – Curva-padrão de GAPDH construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de GAPDH amostra de tecido de camundongo, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Neste teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de baço de todos os grupos em duplicata.....84

Figura 26 – Curva-padrão de GAPDH construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de GAPDH amostra de tecido de camundongo, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Neste teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de linfonodo de todos os grupos em duplicata.....84

Figura 27 – Avaliação da expressão das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em amostras de baços dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). *: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.....86

Figura 28 – Avaliação da expressão das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em amostras de linfonodo dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Não houve diferença estatística entre os grupos.....88

Figura 29 – Curva-padrão do gene de *Leishmania chagasi* construída a partir do fragmento de DNA do parasita, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Neste teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de baço dos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) em duplicata.....89

Figura 30 – Infecção por *L. chagasi* em baço de camundongos BALB/c dos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). O gráfico mostra a carga parasitária por MG de fragmento de tecido por PCR em tempo real. As barras representam o desvio-padrão dos resultados. * indica que houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).....90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos de animais em experimentação, quantidade de animais por grupo, procedência dos inóculos e após quanto tempo ocorreu o sacrifício dos animais.....19

Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional e na PCR em Tempo Real, Sondas fluorogênicas, assim como os seus ciclos, as temperaturas de anelamento e tamanho do produto esperado da amplificação dos cDNAs das citocinas de interesse, assim como dos genes endógenos (β – actina e GAPDH) e para amplificação de genes do gênero *Leishmania*.....39

Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real e na convencional para construção do plasmídeo, assim como seu ciclo, a temperatura de anelamento e tamanho do produto esperado da amplificação do gene *Leishmania* spp.....48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Recuperação antigênica e diluições e tempos dos anticorpos primários utilizados nos cortes de baço e linfonodos de camundongos BALB/c.....34
- Tabela 2 – Resultados das densidades ópticas dos soros de camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais, avaliados pelo ELISA-teste, utilizando-se o antígeno solúvel total (AST) de *L. chagasi*.....51
- Tabela 3 – Resultados das densidades ópticas dos soros de camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais, avaliados pelo ELISA-teste utilizando a proteína recombinante A2-L como antígeno.....53
- Tabela 4 – Produção de IFN- γ (pg/ml) de células de baço e Linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias \pm erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).....56
- Tabela 5 – Produção de IL-2 (pg/ml) de células de baço e Linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias \pm erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).....57
- Tabela 6 – Produção de TNF- α (pg/ml) de células de baço e Linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias \pm erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).....58

Tabela 7 – Produção de IL-4 (pg/ml) de células de baço e Linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias ± erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).....59

Tabela 8 – Produção de IL-10 (pg/ml) de células de baço e Linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias ± erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).....60

Tabela 9 – Identidade verificada pelo programa BLAST® para sequências de DNA de cada fragmento obtidas a partir de reações de PCR de amostras sequenciadas a partir dos plasmídeos.....83

RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE A2 DE *Leishmania chagasi*

Resumo

O agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil, é a *Leishmania chagasi*. Ela é transmitida pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que adquire o parasito ao realizar o hematofagismo em animais infectados. O presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta imune de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante produzido a partir do gene A2-L de *L. chagasi*, amostra isolada de um cão atendido no Hospital Veterinário da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal-SP, e avaliar a capacidade dessa proteína recombinante em induzir imunoproteção nos animais, após desafio com o parasito. Quarenta camundongos foram divididos em quatro grupos: G1, 10 animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*; G2, 10 animais inoculados com a proteína recombinante A2-L; G3, 10 animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*; G4, 10 animais inoculados com solução salina (controle negativo). Os parâmetros da resposta imune humoral avaliados foram anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2a, pelo ELISA indireto. Quanto à resposta imune celular, avaliou-se a produção de células CD4⁺ e CD8⁺, pela técnica de citometria de fluxo e, as imunomarcações de CD4⁺, CD8⁺, iNOS, macrófagos, MHC I, MHC II e Linfócitos B, pela técnica de imunohistoquímica. A produção de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10), pela técnica de PCR em Tempo Real Quantitativo de Transcrição Reversa (RT-qPCR) e, a carga parasitária dos baços dos camundongos infectados com o parasita por qPCR. O grupo G3 teve um padrão de resposta humoral do tipo Th1=Th2, enquanto o grupo G1, o padrão de resposta foi do tipo Th1<Th2. O grupo G3 também apresentou maior produção de linfócitos CD8 e de células expressando MHC I, MHC II e iNOS. O grupo G3 se sobressai na produção de mRNA da IL-2, do IFN- γ e do TNF- α , pelas células do baço. A carga parasitária foi significativamente menor, no grupo G3, menos da metade daquela encontrada no grupo G1. Concluímos, portanto que o grupo G3 produziu um padrão de resposta humoral e celular, que segundo a literatura, sugere ser efetivo no combate ao parasita.

Palavras-chaves: A2, BALB/c, *Leishmania chagasi*, qPCR, resposta celular.

IMMUNE RESPONSE OF BALB / c MICE IMMUNIZED WITH A2 RECOMBINANT PROTEIN OF *Leishmania chagasi*

SUMMARY – The causative agent of the disease in Brazil is *Leishmania chagasi*. It is transmitted by the bite of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, which acquires the parasite to realize the hematophagism in infected animals. This work aimed to study the immune response of BALB / c mice immunized with the recombinant protein produced from A2-L gene of *L. chagasi*, isolated sample of a dog the Veterinary Hospital of FCAV-UNESP, Jaboticabal and to evaluate the ability of this recombinant protein to induce immunoprotection in animals after challenge with the parasite. Forty mice were divided into four groups: G1, 10 animals inoculated with *L. chagasi* promastigotes; G2, 10 animals inoculated with the recombinant protein A2-L; G3, 10 animals immunized with the recombinant protein A2-L and challenged with promastigotes of *L. chagasi*; G4, 10 animals inoculated with saline (negative control). Characteristics evaluated humoral immune response were antibodies of the IgG class and IgG1 and IgG2a subclasses, the indirect ELISA. As for the cellular immune response, we evaluated the production of CD4⁺ and CD8⁺ by flow cytometry technique and evaluated the immunoblots of CD4⁺, CD8⁺, iNOS, macrophages, MHC I, MHC II and B lymphocytes, by the technique of immunohistochemistry. The production of cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10) by RT-PCR in real time and, the parasite load of the spleens of mice infected with the parasite by qPCR. The G3 had a pattern of humoral response Th1 = Th2, while the G1, the pattern was Th1 < Th2. The G3 group also showed higher production of CD8 cells and cells expressing MHC I, MHC II and iNOS. The group G3 excels in the production of IL-2, IFN- γ and TNF- α , mRNA the spleen cells. The parasite load was significantly lower in the group G3, less than half of that found in G1. We therefore conclude that the G3 group produced a pattern of humoral and cellular responses, which according to literature suggests be effective in combating the parasite.

Keywords: A2, BALB/c, cellular response, *Leishmania chagasi*, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose considerada como uma das seis doenças tropicais mais importantes nos países em desenvolvimento. O agente etiológico da enfermidade no Brasil, a *Leishmania chagasi*, é transmitida aos animais, incluindo os seres humanos, pela picada do vetor, um flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que adquire o parasito ao realizar o hematofagismo em animais infectados. Anteriormente, descrita como uma enfermidade silvestre ou de ambiente rural, atualmente, observa-se um grande número de casos da doença em áreas urbanas. Os sinais clínicos da LV incluem anemia, febre intermitente, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, caquexia progressiva e a doença pode levar semanas ou anos para se desenvolver. Dentre os sintomas menos frequentes estão linfadenopatia, diarreia persistente e sintomas neurológicos (ASHFORD, 2000; LIMA *et. al.*, 2003).

As medidas de controle da LV visam aos três elementos da cadeia de transmissão: os vetores (flebotomíneos), o reservatório principal (cães domésticos) e o homem doente (CASTRO *et. al.*, 1996). A eliminação do cão positivo para leishmaniose com sinais clínicos ou não é o ponto mais controverso, mesmo sendo esse animal o principal reservatório doméstico. Veterinários e sociedades protetoras de animais têm questionado a eutanásia de cães positivos. Porém não existe um tratamento comprovado que elimine definitivamente o parasito do organismo canino, evitando que esse seja fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, para o homem (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997).

O impacto da remoção dos cães soropositivos para leishmaniose, no Brasil, tem sido questionado por vários autores, devido a sua eficácia dúbia, custo e

resistência dos proprietários a aderir ao controle (PALATNIK de SOUSA *et. al.*, 2001). A utilização de uma vacina profilática humana ou canina poderia representar uma forma de controle eficiente da enfermidade (BORJA-CABRERA *et. al.*, 2002).

No laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-Unesp Jaboticabal, Oliveira *et. al.* (2011a) clonaram e Jusi *et. al.* (2015) expressaram, pela primeira vez no Brasil, o gene da proteína A2-L de um isolado de *L. chagasi*. A amostra de *L. chagasi* utilizada foi isolada, em Jaboticabal-SP, por Machado & Tinucci-Costa (2004 dados não publicados) de um cão que pertencia a um canil da cidade de Colina-SP, o qual foi adquirido com um ano de idade por um criador da região de Araçatuba-SP, e essa amostra foi criopreservada em 10% de glicerol. Essa amostra foi caracterizada como pertencente ao complexo *Donovani* por métodos moleculares (CORTES *et. al.*, 2004) e como *L. chagasi* por testes realizados pela Dra. Vanete Thomaz Soccol, do laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Jusi *et. al.* (2015) expressaram uma proteína de 11 KDa, a qual denominaram A2-L, a partir do clone isolado por Oliveira *et. al.* (2011a), utilizando o vetor de expressão pET 28a (Novagen) em diferentes células de expressão de *Escherichia coli*, sendo elas: BL21 (DE3), Rosetta e ER 2566. De posse dos resultados, optou-se por trabalhar apenas com a expressão na célula BL21 (DE3). A expressão da proteína recombinante foi obtida pela indução das culturas de *E. coli* com IPTG (Isopropiltiogalactosídeo). A proteína expressa foi purificada pelo método de cromatografia de afinidade, utilizando-se o kit para purificação da proteína recombinante His Grav Trap (GE Healthcare).

Estudos de diagnóstico de leishmaniose canina com essa proteína recombinante A2-L foram realizados por Jusi *et. al.* (2015), além de testes iniciais de imunogenicidade em camundongos BALB/c. Assim, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade aos estudos com essa proteína produzida a partir do gene A2-L isolado de *L. chagasi*, para estudar a resposta imune de camundongos BALB/c. A continuidade de estudo nessa linha traz resultados valiosos, uma vez que, entendendo a resposta imune nesses animais, sabe-se a potencialidade dessa proteína. Cabe lembrar que o “lócus” A2 é composto por no mínimo sete genes, que diferem em relação ao comprimento das sequências que codificam a unidade peptídica repetitiva (GHEDIN *et. al.*, 1997). Portanto, a proteína A2-L expressada é diferente daquelas descritas na literatura, como a utilizada na vacina comercial Leish-Tec[®], a qual se refere a uma proteína recombinante A2 obtida de subclones do gene de *Leishmania donovani*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. INTRODUÇÃO À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

No Brasil, a leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é uma zoonose, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (CASTRO, 1996).

As primeiras observações e descrições do gênero *Leishmania* foram feitas no fim do séc. XIX e, atualmente, são descritas cerca de trinta espécies desse gênero. Todas as espécies são morfologicamente muito semelhantes entre si, porém, são responsáveis pela ocorrência de enfermidades com características clínicas e epidemiológicas bastante diferentes (REY, 2001). Pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e divididas em subgêneros, complexos, espécies e subespécies, a espécie *Leishmania chagasi*, do complexo *Donovani*, subgênero *Leishmania*, é a espécie responsável pela ocorrência da leishmaniose visceral no Brasil (NEVES, 2006).

A transmissão dos parasitas para os hospedeiros vertebrados ocorre pela picada do inseto vetor. Diferentes espécies de flebotomíneos hematófagos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, são os transmissores das leishmanioses na América e, assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* (FUNASA, 1999). Os flebotomíneos são mosquitos de tamanho bastante reduzido, cerca de 2 a 3 mm, com hábitos peridomésticos e intradomiciliares, que fazem seu ciclo larvar na matéria orgânica úmida. Esse fato que dificulta o combate desses vetores (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). O vetor da leishmaniose visceral no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*, porém outros trabalhos mostram o possível envolvimento de outras espécies de *Lutzomyia*, como a *Lutzomyia cruzi*, na transmissão da leishmaniose visceral em áreas não endêmicas da América do Norte e do Sul (TRAVI *et. al.*, 2002; DE PITA-PEREIRA *et. al.*, 2008).

2.2. CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIAS

Leishmanias são parasitos digenéticos (heteroxenos) que apresentam duas formas durante seu ciclo biológico: a forma extracelular chamada promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a forma amastigota, que é um parasita intracelular obrigatório observado no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado. Um inseto vetor infectado, ao se alimentar de um hospedeiro vertebrado, pode infectá-lo regurgitando formas promastigotas metacíclicas (REY, 2001; STRAUSS, 2001). Essas promastigotas são fagocitadas por células do hospedeiro vertebrado residentes no local da picada, tais como: macrófagos, monócitos e células de *Langerhans* (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; ENGWERDA *et al.*, 2004). O parasita se diferencia na forma amastigota após a interiorização por essas células. O ambiente ácido que se forma dentro dessas células de defesa, devido à fusão dos lisossomos com o fagossomo (vacúolo que contém o parasita) formando o fagolisossomo, o qual originará o vacúolo parasitóforo, não é suficiente para matar o parasita, uma vez que a forma amastigota consegue sobreviver em ambiente ácido. A amastigota tem forma arredondada e não apresenta flagelo aparente (por ser interiorizado). Dentro do vacúolo em que se encontra, iniciam-se os processos de reprodução por divisão binária simples até o rompimento dessas células e liberação de novos parasitas que irão ser fagocitados por novas células (HOMMEL, 1999; NEVES, 2006). Os macrófagos infectados são drenados para os linfonodos e, no caso das leishmanias do complexo *L. donovani*, os parasitas têm um tropismo para órgãos como o baço, fígado e medula óssea, causando a visceralização da doença. Um flebotomíneo ainda não infectado pode ingerir células infectadas com as formas amastigotas ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. No tubo digestivo do inseto vetor, as formas amastigotas passam a ser flageladas e denominam-se promastigotas. Essas formas podem ser encontradas livres ou presas à parede intestinal do flebótomo pelo flagelo e se multiplicam também por divisão binária simples. Em poucos dias, o intestino fica repleto de promastigotas (NEVES, 2006). A Figura 1 apresenta o ciclo biológico da *Leishmania* spp.

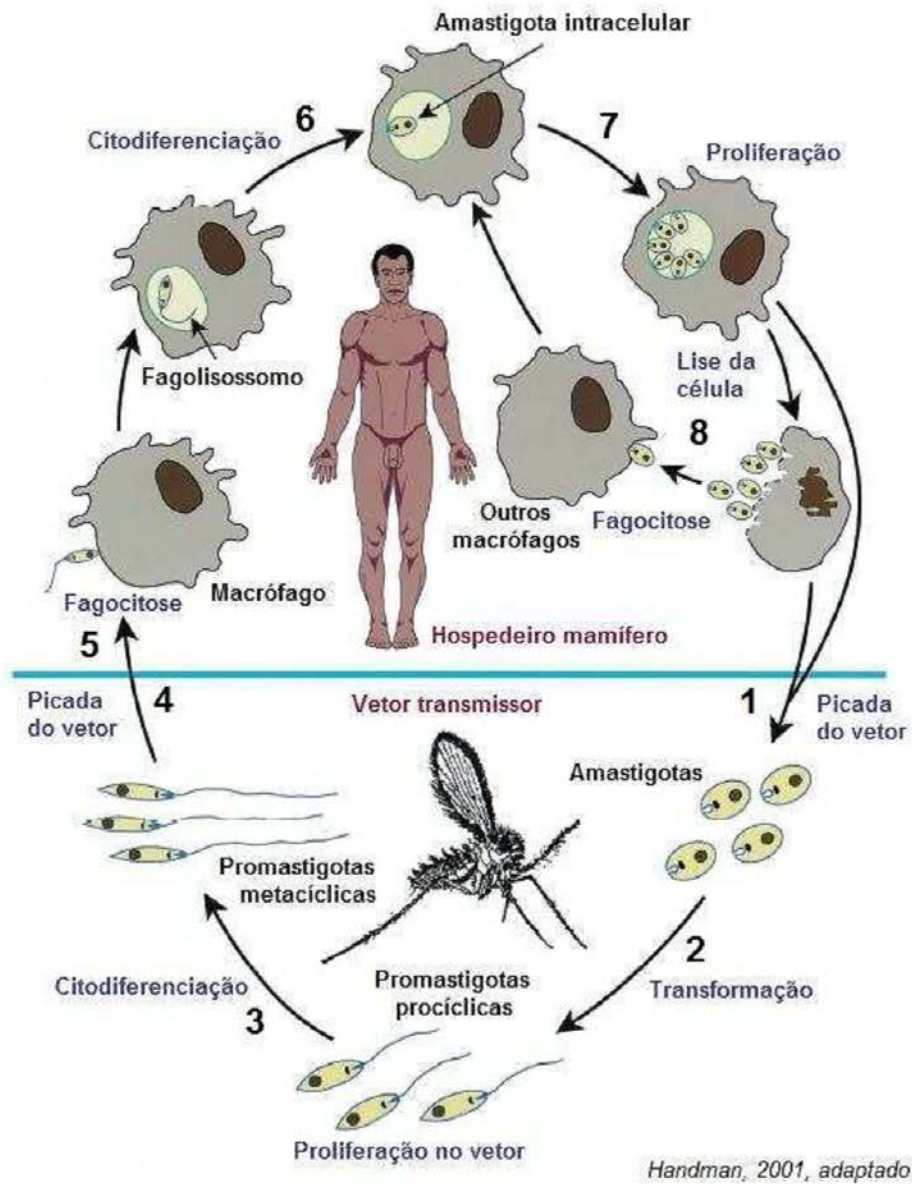


Figura 1 – Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*. (1) Macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor durante seu repasto sanguíneo; (2) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas e, posteriormente, (3) em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e (4) são transmitidas após a picada na derme do hospedeiro; (5) ocorre, então, a fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (6) no interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e (7) iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. (8) Os macrófagos infectados são lisados, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células (Fonte: adaptado de Handman, 2001).

2.3. IMUNOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

Ao penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado, o protozoário inicia sua interação com o sistema imunológico. Neutrófilos, células polimorfonucleares, são as primeiras células a migrarem para o tecido infectado e também são as primeiras a fagocitarem o protozoário (CHANG, 1981; PEARSON e STEIGBIGEL, 1981). Elas produzem enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio na tentativa de destruir os microrganismos. Neutrófilos secretam MIP-2 e KC (homólogos murinos de IL-8) que atraem mais neutrófilos, e MIP-1 α e MIP-1 β , quimioatraentes de monócitos e macrófagos. Antes de entrarem em apoptose, os neutrófilos infectados secretam citocinas que afetam a ativação e a diferenciação dos linfócitos T (revisito por AWASTHI *et. al.*, 2004). O papel dos neutrófilos como promotores ou supressores da infecção ainda não está bem esclarecido. Ribeiro-Gomes e Sacks (2012) sugerem que a influência do neutrófilo durante a infecção dependerá do momento de recrutamento e do tecido em que ocorre. Embora os parasitas sejam encontrados em neutrófilos, é dentro dos fagócitos mononucleares que há melhores evidências sobre sua replicação e sobrevivência. Os macrófagos, ao fagocitarem as células polimorfonucleares apoptóticas infectadas, não exercem suas atividades microbicidas. Esse é um mecanismo de entrada silenciosa da *Leishmania* nas células do hospedeiro. Os macrófagos têm papel fundamental no curso da infecção, pois atuam como células hospedeiras para o parasito, como células apresentadoras de antígeno que modula a resposta imune celular específica e, também, quando ativados, atuam como células efetoras na eliminação do parasito intracelular (ABBAS *et. al.*, 2005).

O IFN- γ , produzido por linfócitos T, células dendríticas, macrófagos e células “*natural killer*” (NK), induz a produção de óxido nítrico, o qual possui ação microbicida (TRINCHIERI *et. al.*, 1993; REINER *et. al.*, 1995). Essa citocina tem papel fundamental no controle da doença, pois limita o crescimento da *Leishmania* sp. em macrófagos de murinos e humanos (MURRAY *et. al.*, 1992). A modulação local ou sistêmica dos níveis de IFN- γ parece ser um determinante crítico na resolução da infecção. Outra citocina que parece atuar juntamente com o IFN- γ , na indução da morte do parasita, pela produção de óxido nítrico, é o fator de necrose

tumoral (TNF- α). O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos, além de linfócitos T e células NK (LIEW *et. al.*, 1993). É uma citocina pró-inflamatória que também induz a ativação de macrófagos e formação de granulomas, auxiliando no combate à infecção (TUMANG *et. al.*, 1994). Porém o excesso de TNF nos órgãos linfoides acaba por mediar dano na estrutura arquitetônica do tecido e causa disfunção imunológica associada a um estado inflamatório crônico (ENGWERDA *et. al.* 2004)

O padrão proposto por Sacks e Noben-Trauth (2002) de resposta Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade à infecção foi definido utilizando-se camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Nessa mesma linha de trabalho, foi proposto que a interleucina-12 (IL-12) e a interleucina-4 (IL-4) estariam relacionadas com o desenvolvimento de respostas Th1 e Th2, respectivamente (ALEXANDER e BRYSON, 2005). No entanto, outros trabalhos já demonstraram que, no caso da leishmaniose visceral, a IL-4, ao contrário da IL-10, não está envolvida na susceptibilidade da doença (GHALIB *et. al.*, 1993; GOTO e LINDOSO, 2004).

No caso da LV, alguns autores consideram que a susceptibilidade não esteja relacionada com uma resposta Th2 acentuada e sim na falta de uma resposta Th1 eficiente, por influência da IL-10 e do TGF-beta (WILSON *et. al.*, 1998, WILSON *et. al.*, 2005; MIRALLES *et. al.*, 1994). A IL-10 diminui o dano colateral que poderia causar uma resposta inflamatória exacerbada, pois tem ação inibidora da produção de IFN- γ e desativadora de macrófagos. Entretanto, esse controle também resulta no fracasso durante a tentativa de eliminação total do parasita (TRINCHIERI, 2007; TRIPATHI *et. al.*, 2007). Em um trabalho que utilizou camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, inoculou-se anticorpo monoclonal bloqueador do receptor para IL-10 (IL-10R). O resultado foi que o bloqueio deste receptor induzia a morte do parasito, demonstrando-se a importância da IL-10 na LV (MURRAY *et. al.*, 2002).

O óxido nítrico (NO), assim como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, possui atividade leishmanicida dos macrófagos. O NO é produzido em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). IFN- γ e TNF- α são citocinas que estimulam a produção de iNOS, enquanto as citocinas IL-4, IL-10 a inibe (BRUNET, 2001; VAN der VEEN, 2001).

Murray *et. al.* (1993) demonstraram o papel da IL-2 atuando na destruição do parasita, ao induzir a produção de IFN- γ e consequente formação de granuloma e envolvimento de ambos os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Experimentos anteriores já haviam demonstrado a necessidade desses linfócitos T na proteção contra o parasita *L. donovani* (STERN, *et. al.*, 1988). Entretanto, estudo órgão-específico, utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, demonstrou que a participação das linfócitos T CD4⁺ são importantes nas duas semanas iniciais, principalmente para a formação de granulomas no fígado. Em seguida, essa população celular decresce e cresce a população de linfócitos T CD8⁺, a qual está associada à destruição dos parasitos (McELRATH *et. al.*, 1988). Gomes-Pereira *et. al.* (2004) demonstraram a importância das células CD8⁺ no controle da leishmaniose visceral no que diz respeito à resposta imune também no fígado.

Em comparação à resposta imunológica em cães, estudos indicam que animais resistentes à infecção por *Leishmania* spp. dependem da habilidade do hospedeiro em montar uma resposta à célula T específica, com ativação de macrófagos por citocinas derivados de linfócitos T (CARRILLO e MORENO, 2009). Pinelli *et. al.* (1994) demonstraram que cães sintomáticos que desenvolveram formas mais graves da doença exibiram, particularmente, supressão de linfócitos T CD8⁺. Em cães, caracterizou-se que animais resistentes exibem um perfil de resposta Th1, com maior presença de IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Enquanto, cães susceptíveis demonstram um perfil de resposta Th2 com maior concentração de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (PINELLI *et. al.*, 1995, 1999; CORREA *et. al.*, 2007; LAGE *et. al.*, 2007; MENEZES-SOUZA *et. al.*, 2011).

Em relação à produção de classes e subclasses de imunoglobulinas avaliadas em modelos murinos infectados com parasitas *Leishmania amazonensis* e *Leishmania pifanoi*, o que se observa é que o aumento na produção de anticorpos favorece a manutenção da doença, uma vez que, na ausência deste, a infecção não se instala (KIMA *et. al.*, 2000). Miles *et. al.* (2000) também demonstraram que a presença de imunocomplexos formados por IgG, além de não proteger contra a infecção, contribui para a progressão da doença em camundongos BALB/c inoculados com *L. major*. Outro trabalho, utilizando hamsters infectados com *L.*

chagasi, demonstrou que a patogênese de lesões renais estava relacionada a depósitos de imunocomplexos (SARTORI *et. al.*, 1987).

A resistência ou a suscetibilidade da leishmaniose, em diferentes linhagens de animais, está ligada a fatores genéticos do hospedeiro (SACKS e NOBENTRAUTH, 2002). Modelos murinos têm sido muito utilizados nos estudos para desenvolvimento de vacinas contra a LV (AFRIN *et. al.* 2000; CARRIÓN *et. al.* 2006; ZANIN *et. al.* 2007). Camundongos BALB/c são utilizados em infecções com *L. donovani* ou *L. chagasi*, pois apresentam uma resposta imune similar à que ocorre em humanos. Entretanto, o número de estudos de potenciais vacinas contra a LV é significativamente menor do que aqueles relatados contra a Leishmaniose Cutânea (LC). Isso se deve, em parte, ao fato da resposta imune associada à forma visceral da leishmaniose ser ainda pouco entendida, e os resultados obtidos serem controversos (AHMED *et. al.*, 2003).

Apesar da resposta imune em camundongos ser inicialmente similar a que ocorre em humanos, o modelo murino não reproduz todas as características da LV humana. O camundongo BALB/c é o modelo mais utilizado para estudos de infecção por *L. donovani* e *L. chagasi*, pois são vulneráveis à doença com progressão nas duas semanas iniciais. Entretanto, dependendo da infectividade do inóculo, a doença pode ser controlada pelo próprio sistema imune do hospedeiro (MURRAY *et. al.*, 1987). Esse controle é mediado pela produção de IFN- γ por linfócitos T esplênicos e por um padrão de resposta do tipo Th1, com participação da IL-12. O aumento de iNOS mediado por IFN- γ também é crítico no controle da replicação de parasitas em camundongos (MELBY *et. al.*, 2001). Muitos estudos de candidatos à vacina contra *L. chagasi* costumam utilizar altas concentrações de parasitas por mL (10^7 a 10^8), o que consideram como sendo suficiente para causar um desequilíbrio na resposta imune do hospedeiro murino e permite o desenvolvimento da doença (SACKS e MELBY, 2001; AHMED *et. al.*, 2003; MALAFAIA *et. al.*, 2009; PETERS e SACKS, 2006; YAZDANBAKHSH e SACKS, 2010).

O hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*) reproduz os aspectos clínicos e patológicos do que ocorre em humanos (MELBY *et. al.*, 2001; REQUENA *et. al.*, 2000) levando até, à morte (HANDMAN, 2001). Entretanto, em estudos de desenvolvimento de vacinas, o hamster parece não ser um bom modelo devido ao

seu defeito inato para produção de óxido nítrico (NO). E, também, há falta de reagentes específicos para esse modelo animal na realização das análises imunológicas (MELBY *et. al.*, 2001; GOTO e LINDOSO, 2004).

2.4. PROFILAXIA PARA A LEISHMANIOSE

No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença. A importância dos cães advém do fato da leishmaniose visceral canina ser bem mais prevalente que a humana e por estes apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele, o que favorece a infecção dos vetores (ARIAS *et. al.* 1996). As medidas de controle da leishmaniose visceral visam aos três elementos da cadeia de transmissão: os vetores (flebotomíneos), o reservatório principal (cães domésticos) e o homem doente (CASTRO *et. al.*, 1996).

Drogas convencionais requerem um longo tempo de administração e geralmente induzem sérios efeitos colaterais devido à sua toxicidade (CROFT, 1988; MURRAY *et. al.*, 1988). Além de aumentar a incidência de amostras resistentes à droga, têm dificultado também o controle da doença por quimioterapia (CARTER, *et. al.*, 2003; SUNDAR, *et. al.*, 2000).

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro possuem limitações. Vários estudos foram conduzidos na tentativa de criar uma vacina para a leishmaniose canina e, atualmente, há uma vacina comercializada, a Leish-Tec® (Hertape Calier). A Leish-Tec utiliza proteína recombinante obtida do gene A2 de *Leishmania donovani*, obtida por Charest e Matlashewski (1994), porém, ainda necessita estabelecer o nível de proteção em áreas endêmicas.

Até 2014, havia outra vacina comercializada, a Leishmune® (Fort Dodge), que consistia de antígeno purificado (FML – “Fucose Manose Ligand”), feito de um extrato inativado de *Leishmania donovani*, porém, havia o inconveniente de impossibilitar diferenciar animais vacinados de animais infectados. Portanto, o uso dela era restrito às clínicas veterinárias, e o médico veterinário que utilizasse seria responsável pelo teste sorológico do animal, que deveria ser negativo para a

enfermidade antes da vacinação. Pois, uma vez vacinado, o cão seria soropositivo para leishmaniose e estaria sujeito às normas de controle da doença impostas pelo Ministério da Saúde, ou seja, o sacrifício de todos os cães soropositivos (WERKHAUSER, 2004). Entretanto, a licença de fabricação e comercialização dessa vacina foi suspensa, conforme nota técnica (n. 038/2014/DFIP/SDA) emitida em novembro de 2014, porque ela não atendeu aos requisitos para estudo da fase 3 sobre eficácia vacinal em área endêmica.

Proteínas da família A2 são de especial importância, uma vez que são exclusivas da fase amastigota. O gene A2 foi identificado primeiro em *Leishmania donovani* como uma família de genes, cujas proteínas variam de 45 a 100 kDa em tamanho e que apenas são expressos na fase amastigota do parasita (CHAREST & MATLASHESKI, 1994; ZHANG *et. al.*, 1996). Genes da proteína A2 foram encontrados em *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, mas não foram encontrados em *L. major* tampouco em *L. braziliensis*, sendo esses dois últimos os causadores da leishmaniose tegumentar no Velho e Novo Mundo, respectivamente (GHEDIN *et. al.* 1997). Essas proteínas mostraram-se importantes na sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro, uma vez que a expressam sempre que há ambiente inóspito, como diminuição de pH e aumento da temperatura. Neste mesmo estudo, localizaram a proteína dentro do retículo endoplasmático do parasita (McCALL e MATLASHEWSKI, 2010).

Jusi *et. al.* (2015) expressaram uma proteína da família A2-L de *Leishmania chagasi* de 11 kDa e a utilizaram no teste de ELISA, obtendo 63 % de positividade em soros de cães naturalmente infectados. Anticorpos específicos contra a A2 foram detectados em 90% dos soros de pacientes com leishmaniose visceral (GHEDIN *et. al.*, 1997). Além disso, uma significativa proteção obtida contra infecções por *L. donovani* e *L. amazonensis* com resposta imune celular e humoral tem sido quando se usou a A2 como uma proteína recombinante ou uma vacina de DNA em camundongos BALB/c e, mais recentemente, em cães (FERNANDES, *et. al.*, 2008; ZANIN, *et. al.*, 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudar a resposta imune humoral e celular de camundongos BALB/c imunizados com uma proteína recombinante, produzida a partir do gene A2-L isolado de *L. chagasi*, e avaliar a capacidade dessa proteína recombinante em induzir imunoproteção em animais.

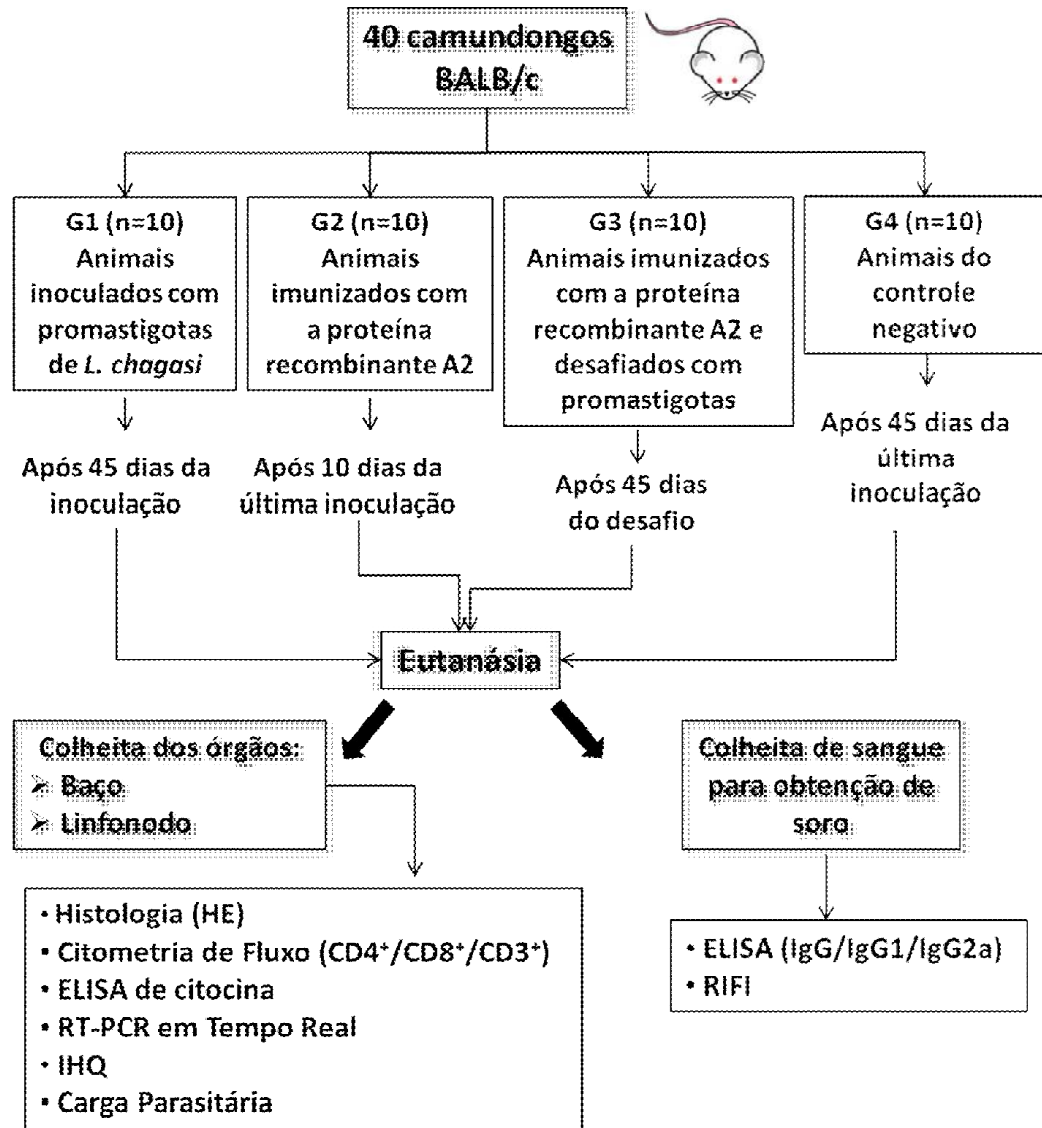
3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a imunogenicidade e antigenicidade da resposta imune produzida após a imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante e, após, desafio com *L. chagasi*;
2. Avaliar os níveis de proteção obtidos com a vacinação de camundongos BALB/c, após desafio com formas promastigotas de *Leishmania chagasi*;
3. Avaliar, pelo ELISA-teste, o perfil dos isotipos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a, produzidos após a imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante e, após, desafio com *L. chagasi*;
4. Avaliar o perfil de citocinas (IL-4, IL-2, IFN- γ , TNF- α , e IL-10), por PCR em Tempo Real e por ELISA, produzidas pelos camundongos, assim como a

resposta de células CD4⁺, CD8⁺, iNOS, linfócitos B, moléculas de MHC de classes I e II e macrófagos, pela técnica de imuno-histoquímica;

5. Avaliar o valor de diagnóstico da proteína recombinante A2-L pelo ELISA-teste, em soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*;
6. Avaliar a carga parasitária no baço dos camundongos dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (Imunizados com a proteína recombinante A2 e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*).

Delineamento Experimental



ELISA de citocina

- ✓ IL-2
- ✓ IL-4
- ✓ IL-10
- ✓ IFN- γ
- ✓ TNF- α

PCR em Tempo Real

- ✓ IL-2
- ✓ IL-4
- ✓ IL-10
- ✓ IFN- γ
- ✓ TNF- α
- ✓ β -actina
- ✓ GAPDH

IHQ

- ✓ CD4⁺
- ✓ CD8⁺
- ✓ Macrófago
- ✓ Linfócito B
- ✓ MHC I
- ✓ MHC II
- ✓ iNOS

4. MATERIAL E MÉTODOS:

I. ELISA-teste – Detecção de anticorpos em soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

I.1.1. Origem das amostras de soros de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp.

Foram testados 1227 amostras de soro de cães oriundos de áreas endêmicas (gentilmente cedidos pelos Centros de Zoonoses de Campo Grande-MS, Recife-PE, do Estado de Tocantins e Ilha Solteira-SP). Apenas as amostras de soro positivas neste ELISA-teste, utilizando-se o antígeno solúvel bruto (n= 891), foram utilizadas no ELISA-teste com a proteína recombinante A2-L, como antígeno, com a finalidade de comparar os dois antígenos. O ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das densidades ópticas dos soros de referência negativos (amostras de soro de cães sorologicamente negativos de áreas não endêmicas), conforme preconizado por MACHADO *et. al.*, (1997), para o sistema de *B. bovis*.

I.1.2. Preparação do antígeno total solúvel de *Leishmania chagasi*

Os parasitas em meio de cultura foram centrifugados a 3.000 rpm (Sorwall), por dez minutos, e o sobrenadante, descartado. Posteriormente, foram feitas duas lavagens dos parasitas com Salina Tamponada com Fosfato, 0,01M, pH 7,4 (PBS). Após as lavagens, os parasitas foram ressuspensos em tampão de homogeneização (1 mM de EDTA; 5 mM de Trietanolamina-HCl; H₂O q.s.p., pH 7,5) e armazenados a -70° C. Seguiram-se, aproximadamente, 4 ciclos iguais ao descrito acima, com a finalidade de se obter grande quantidade de parasitas.

A suspensão de parasitas armazenada foi então submetida à lise celular em sonicador de células (Branson Sonifier 250), com potência de 100%, com pulsos de 20 segundos a cada 15 segundos por seis vezes. O lisado celular foi centrifugado a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C e, alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram

congeladas a -70° C, até o momento do uso. O conteúdo proteico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicinônico, utilizando-se o “kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit-Pierce Chemical Company, cat. n. 23.225), de acordo com as recomendações do fabricante.

I.1.3. Elisa-teste na Detecção de Anticorpos nos soros de cães

O ELISA-teste, utilizando-se o antígeno total solúvel de *Leishmania chagasi*, foi realizado conforme descrito por Oliveira *et. al.* (2008), com ligeiras modificações, para os soros de cães de áreas endêmicas. As diluições ótimas do antígeno do conjugado e dos soros-controle positivos e negativos foram determinadas por titulação em bloco. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (Maxisorp, Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Foram adicionados 100 μ L do antígeno solúvel de *L. chagasi*, diluído na concentração de 10 μ g/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4° C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37° C, por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100 μ L dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1: 400 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas a 37° C por 90 minutos e lavadas, como descrito anteriormente; 100 μ L do conjugado canino acoplado à fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de cão, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # A-0793), diluído 1: 4.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas

de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

I.1.4. Detecção de anticorpos anti-A2-L nos soros de cães

O ELISA-teste, utilizando-se o antígeno recombinante A2-L de *Leishmania chagasi*, foi realizado conforme descrito por Jusi *et. al.* (2015). As diluições ótimas do antígeno, do conjugado e dos soros controles positivos e negativos foram determinadas por titulação em bloco. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (Maxisorp, Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Foram adicionados 100 µL do antígeno recombinante A2-L, diluído na concentração de 2,5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4° C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 80 (PBS-Tween 80). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 80, acrescido de 3% de soro normal de coelho, em câmara úmida, a 37°C, por 2 horas. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100 µL dos soros-teste e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1:50 em PBS-Tween 80, com 3% de soro normal de coelho. As microplacas foram então novamente incubadas a 37°C por 60 minutos e lavadas, como descrito anteriormente; 100 µL de cada conjugado anti-cão acoplado à fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de cão, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # A-0793), diluídos 1: 4.000 em PBS-Tween 80, acrescidos de 3% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,6; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

II. Protocolos de imunização, infecção, eutanásia e colheita dos órgãos dos camundongos

II.1.1. Camundongos

Camundongos BALB/c de seis a oito semanas de idade, SPF (*Specific Pathogen Free*), pesando de 20 a 25g, foram obtidos do biotério da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto-SP. Eles receberam alimento e água *ad libitum* e foram mantidos no biotério do departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, seguindo-se as normas do Comitê de Ética da própria instituição. Foram utilizados 40 animais divididos em quatro grupos, conforme Quadro 1.

Quadro 1. Grupos de animais em experimentação, número de animais por grupo, procedência dos inóculos e períodos de tempo para eutanásia desses animais.

Grupos	nº de animais	Inóculos	Sacrifício após dias de infecção ou após última imunização
1	10	Animais inoculados com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> , sendo essa amostra oriunda de Belo Horizonte-MG, amostra MHOM/DR/73/BH46 (cedida pela Profa. Dra. Maria Norma de Melo).	45
2	10	Animais imunizados com a proteína recombinante A2-L	10
3	10	Animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> , sendo essa amostra oriunda de Belo Horizonte-MG, amostra BH46	45
4	10	Animais como controle negativo	45

Fica esclarecido que, devido ao pequeno tamanho dos linfonodos dos camundongos, foram utilizados grupos extras, exclusivamente para a técnica de citometria de fluxo. Portanto, foram acrescentados dez animais em cada grupo e que foram utilizados exclusivamente para a obtenção de linfonodos para essa técnica.

Os animais de cada grupo foram eutanasiados, conforme os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 005965/11.

II.1.2. Protocolo de Imunização dos grupos (2, 3 e 4)

Camundongos BALB/c do grupo 2 (n=10/grupo) foram imunizados com a proteína recombinante A2-L na concentração final de 20 µg/camundongo, via intramuscular, em três doses, com intervalos de 15 dias cada, emulsionada com o adjuvante. Na primeira dose, a solução de proteína foi emulsionada em adjuvante completo de Freund (proporção 1:1); na segunda e na terceira dose, em adjuvante incompleto de Freund (AIF) na mesma proporção. Dez dias após a última imunização, os camundongos do grupo 2 foram eutanasiados para colheita dos seguintes órgãos: baço e linfonodos. Os animais do grupo 3 (n=10/grupo) foram inoculados conforme o grupo 2, com a diferença que, após 10 dias da última imunização, foram inoculados com promastigotas de *Leishmania chagasi* (amostra BH46) e, só após 45 dias dessa inoculação, eles foram eutanasiados. Os animais do grupo 4 – controle (n=10/grupo) foram inoculados com três doses, com 15 dias de intervalo entre cada uma, sendo estas: a primeira com salina mais adjuvante completo de Freund (na proporção 1:1) e as duas posteriores com salina mais adjuvante incompleto de Freund, na mesma proporção. O mesmo procedimento para a colheita de órgãos foi feito com os animais desse grupo após 45 dias da última inoculação.

II.1.3. Infecção dos grupos G1 e G3 e eutanásia

As amostras de *L. chagasi* em meio de cultivo foram transportadas até o o laboratório de imunoparasitologia, sendo transferida uma alíquota para o meio RPMI, com pH 6,8, e o restante foi criopreservado em meio de cultivo com 10% de glicerol. A alíquota inoculada em novo meio ficou em cultivo por cerca de 7 dias. No dia da inoculação, o meio contendo as formas promastigotas foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para contagem dos parasitos. Essa contagem foi realizada em câmara de NEUBAUER (nos quadrantes para contagem de leucócitos) e ajustada para a concentração de 1×10^7 parasitos/mL de PBS. Em pouco tempo, os parasitos em fase logarítmica de crescimento foram suspensos em uma diluição 1:10 (100 µL do meio de cultura e 900 µL de PBS) e homogeneizados. Uma alíquota

deste foi utilizada para preenchimento da câmara de contagem, o que se obteve por capilaridade. Foram contados 2 quadrantes, calculada a média e o valor multiplicado por 10 (diluição). Esse resultado foi multiplicado pelo volume da câmara para esse quadrante (no caso, 1×10^4 mL, portanto, $N = C.D \times 10^4$ células/ml, sendo N o número de células por mL; C o número de células contadas e D a diluição utilizada). O resultado final foi expresso em número de parasitas/mL. Rosetas ou emaranhados não foram contados. Os animais foram inoculados pela via endovenosa na veia lateral da cauda (OLIVEIRA *et. al.*, 2011b).

Os animais do grupo 1 foram inoculados conforme descrito acima e eutanasiados após 45 dias, enquanto os animais do grupo 3 foram inoculados 10 dias após a última imunização e eutanasiados após 45 dias da inoculação.

II.1.4. Colheita e preparação de material (baço e linfonodo) para análises de Expressão de RNA, Histopatologia, Imuno-histoquímica, Imunofluorescência Indireta em Tecidos, ELISA-teste para dosagem de citocinas e Citometria de Fluxo.

Imediatamente após a eutanásia, foram colhidos, de forma asséptica, fragmentos dos órgãos para a realização de cinco diferentes técnicas. Para a primeira técnica (expressão de RNA), fragmentos de 10 mg de linfonodo e 10 mg de baço foram acondicionados em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, contendo 300 μ L de RNALater – RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Cat. N. 76104). Esses fragmentos foram mantidos a 4°C e, em seguida, processados para a extração do RNA total para a avaliação da expressão do mRNA das citocinas de interesse. Para a segunda e terceira técnicas (dosagem de citocinas pelo ELISA-teste e citometria de fluxo), fragmentos de baço e linfonodo foram colhidos e, imediatamente, colocados em placa de Petri estéril, contendo meio de cultura RPMI, pH 6,8 com antifúngico e antibiótico da Gibco (Invitrogen, Cat. N. 15240-096) e processados o mais rápido possível em cultivo celular.

Para a quarta técnica (material parafinado), fragmentos desses mesmos órgãos foram colhidos e fixados em formol a 10%, tamponado com fosfatos 0,15 M, pH 7,2, por 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções de

concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, de acordo com a técnica histológica de rotina. Os cortes foram feitos na espessura de 5 µm. De cada material embocado, foram confeccionadas lâminas para estudos histológico, imuno-histoquímico e RIFI em tecidos. Ainda, para a técnica de histopatologia, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, para posterior identificação das principais alterações morfológicas.

Na realização das técnicas de estudo histológico, imuno-histoquímica e PCR em Tempo Real, foram colhidos os linfonodos poplíteos. Para as demais técnicas, além destes, também foram colhidos os linfonodos mandibulares, axilares e mesentéricos.

Para a quinta técnica, um fragmento de baço, apenas dos grupos 1 e 3, foi coletado em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C, até o momento de extração de DNA a ser utilizado na técnica de PCR em Tempo Real para quantificação de carga parasitária.

III. RIFI e ELISA das amostras de soros dos camundongos

III.1.1. Obtenção de soro para detecção de anticorpos anti-*L. chagasi* e anti-A2-L

Na data prevista para cada grupo (G1, G2, G3 e G4), conforme Quadro 1, 10 animais de cada grupo foram eutanasiados para colheita de órgãos e sangue. O sangue colhido foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante distribuído em alíquotas, as quais foram congeladas a -20°C. Essas amostras de soro foram utilizadas posteriormente para a detecção de anticorpos anti-*L. chagasi* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pelo ELISA na detecção de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania chagasi*.

III.1.2. Detecção de anticorpos anti-IgG, IgG1 e IgG2 de *Leishmania chagasi* nos soros de camundongos pelo ELISA-teste

A padronização deste ELISA-teste, utilizando-se o antígeno solúvel total (AST) de *L. chagasi* (preparação do antígeno descrito anteriormente no item I.1.2), foi feita com a utilização de soro dos camundongos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

As diluições ótimas do antígeno, do conjugado e dos soros controles positivos e negativos foram determinadas por titulação em bloco. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (Maxisorp, Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Foram adicionados 100µL do antígeno, diluído na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4° C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 3% de leite em pó desnatado (Molico), em câmara úmida, a 37°C por 1 hora. Após nova lavagem para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados, 100 µL dos soros-teste e dos soros de referência positivos e negativos, diluídos 1: 50 em PBS-Tween 20, com 3% de leite

em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas a 37°C por 2 horas e lavadas, como descrito anteriormente; Após, 100 µL do conjugado anti-*mouse* acoplado à fosfatase alcalina (anti-IgG de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # A-3562, diluído 1:10.000; anti-IgG1 de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # SAB3701172-1, diluído 1:5000; anti-IgG2a de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # SAB3701179-1, diluído 1:20.000 em PBS-Tween 20), foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação por 2 horas e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 60 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

III.1.3. Detecção de anticorpos anti-A2-L nos soros de camundongos pelo ELISA-teste

A padronização deste ELISA-teste, utilizando-se a proteína recombinante A2-L, foi feita com a utilização do soro dos camundongos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

O ELISA-teste, utilizando-se o antígeno recombinante A2-L de *Leishmania chagasi*, foi realizado conforme descrito por Jusi *et. al.* (2015), com ligeiras modificações para os soros dos camundongos. As diluições ótimas do antígeno, do conjugado e dos soros-controle positivos e negativos foram determinadas por titulação em bloco. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (Maxisorp, Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Foram adicionados 100 µL do antígeno recombinante A2-L, diluído nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4° C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 3% de leite em pó desnatado (Molico), em câmara úmida, a 37° C por 1 hora. Após nova lavagem para a retirada

da solução de bloqueio, foram adicionados, em duplicata, 100 µL dos soros-teste e dos soros de referência positivos e negativos, diluídos 1: 10; 1: 20 e 1: 50 em PBS-Tween 20, com 3% de leite em pó. As microplacas foram então novamente incubadas a 37° C por 2 horas e lavadas, como descrito anteriormente; Após, 100 µL do conjugado anti-*mouse* acoplado à fosfatase alcalina (anti-IgG de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # A-3562, diluído 1:10.000; anti-IgG1 de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # SAB3701172-1, diluído 1:20.000; anti-IgG2a de camundongo, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # SAB3701179-1, diluído 1:20.000), diluído em PBS-Tween 20, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação de 1 hora e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

III.1.4. RIFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp

A RIFI foi realizada conforme técnica padronizada por Oliveira *et. al.* (2008), para diagnóstico sorológico de animais experimentais para todos os soros de camundongos (G1, G2, G3 e G4). Foram utilizadas formas promastigotas como substrato antigênico em lâminas para a RIFI.

III.1.4.1. Cultivo do antígeno

Antígeno de formas promastigotas foi obtido conforme metodologia descrita por Oliveira *et. al.* (2008).

O meio em que se encontravam, os parasitas foram separadamente centrifugados a 3.000 rpm, por dez minutos, e os sobrenadantes descartados. Posteriormente, foram feitas três lavagens dos parasitas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 a 0,01M.

Após a terceira lavagem, os parasitas foram ressuspensos em PBS, acrescido de paraformaldeído a 4%, e deixados por 30 minutos para a fixação dos parasitas. Com a fixação, os parasitas foram novamente lavados por três vezes com solução de PBS, e o *pellet* de parasitas foi ressuspensão em PBS até a concentração de 3×10^6 a 4×10^6 parasitos por mL.

Utilizando-se lâminas previamente demarcadas com círculos, foram depositados 10 μ L da suspensão de parasitas em PBS em cada círculo, de modo a ter de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, com objetiva de 40X. Após secagem por 6 a 8 horas à temperatura ambiente, as lâminas foram devidamente embaladas em papel extrafino e papel alumínio, e estocadas a -20°C , em recipiente hermeticamente fechado, até o momento de uso.

III.1.4.2. Descrição da RIFI

As lâminas com substrato antigênico com formas promastigotas, foram retiradas do *freezer* e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, foram dispensados 10 μ L de cada soro teste diluído (a fim de se encontrar a diluição inicial, foram feitas titulações dos soros de camundongos infectados e sadios, nas diluições de 1:10/1:20/1:40 e 1:80). As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C , por 40 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão de cinco minutos cada. Após secagem à temperatura ambiente, os círculos da lâmina foram recobertos com 10 μ L do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, cat. # F0257), diluído a 1:64, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas, conforme descrito acima. Após a secagem, as lâminas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M de pH 9,6 e, posteriormente, observadas em microscópio equipado com luz fluorescente (Olympus, BX-FLA).

IV. ELISA de citocina dos sobrenadantes de células dos camundongos

IV.1.1. Preparo de células esplênicas e de linfonodos para ELISA de citocina

Fragmentos do baço e linfonodos dos camundongos dos grupos G1, G2, G3 e G4, colhidos para o cultivo celular, foram o mais rápido possível divulsionados com o auxílio de uma pinça dente de rato e uma pinça de dissecação, no meio RPMI, objetivando liberar as células separadamente do estroma. Em seguida, a solução de células e estroma de cada órgão foi passada por uma seringa com agulha 0,80 x 25 mm e, em seguida, filtrada, utilizando-se uma seringa de 10 mL como coluna, contendo um fragmento de náilon de meia-calça descartável autoclavada de mulher. O filtrado de cada órgão de cada animal, foi centrifugado por 5 minutos, 3.000 x rpm, a 25°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 10 mL de PBS estéril, para lavagem. Apenas as amostras de baço foram submetidas à lise das hemácias com Tris-Cloreto de amônio 0,83% estéril durante 3 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores e submetidas à nova lavagem com PBS. A viabilidade celular foi realizada, utilizando-se o aparelho da Bio-Rad TC10 Automated Cell Counter.

IV.1.2. Estímulo de células esplênicas e de linfonodos *in vitro* para ELISA de citocinas

Após a última lavagem em PBS, conforme descrito no item anterior, as células foram ressuspensas em meio RPMI incompleto até que, aproximadamente, 1×10^6 células fossem adicionados em triplicatas nos poços de uma placa de cultivo celular de 24 poços (EasyPath, Brasil, cat. n. EP-51-25243), os quais continham meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino, no volume final de 700 μ L cada poço. A suspensão celular foi então submetida a três tratamentos distintos:

- 1.) sem estímulo exógeno (Meio – controle negativo);
- 2.) estimulados com ConA (5,0 μ g/mL), uma lectina que se apresenta como potente mitógeno de células T (controle positivo);

3.) com adição de antígeno recombinante A2-L (25 µg/mL), para se observar as respostas antígeno-específicas.

As células foram cultivadas por 72 horas, a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. E, após 24, 48 e 72 horas, foram colhidas alíquotas do sobrenadante para a realização de detecção de citocinas.

IV.1.3. Dosagem de citocinas pelo ELISA

A metodologia para a dosagem de citocinas pelo ELISA-teste é a descrita pelo fabricante para cada kit. O nome dos kits são: Mouse TNF ELISA set (cat. n. 555268); Mouse IFN-gama ELISA set (cat. n. 551866); Mouse IL-2 ELISA set (cat. n. 555148); Mouse IL-10 ELISA set (cat. n. 555252); Mouse IL-4 ELISA set (cat. n. 2651KI). Para cada citocina há pequenas diferenças, mas, basicamente, todos os ensaios de ELISA foram realizados em placas de fundo chato (Maxisorp, NunclonTM Surface, Nunc. Denmark). Foram adicionados 100µL do antígeno de captura, diluídos na concentração de 1: 250 em tampão apropriado (0,1M do Carbonato de Sódio, pH9,5 para IL-2, IL-4 e IFN e 0,2M de Fosfato de Sódio, pH 6,5 para IL-10 e TNF), em cada cavidade das microplacas. Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4^o C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas (5 lavagens para IFN), com tampão PBS 0,01M, pH 7, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). O bloqueio foi feito com 200 uL de Solução Diluente, a qual consistia em PBS (sem Tween20) mais 10% de soro fetal bovino inativado e incubado em temperatura ambiente por 60 minutos. Após lavagem, como descrito anteriormente para a retirada do bloqueador, foram adicionados, 100 µL dos sobrenadantes testes (previamente centrifugados por 5 minutos a 2.000 rpm) e dos padrões (preparados previamente conforme instruções do fabricante). As microplacas foram então novamente incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas cinco vezes consecutivas; 100 µL do Detector, diluídos conforme instruções do fabricante, foram adicionados e incubados novamente nas mesmas condições. Antes de acrescentar o substrato, a placa foi lavada por sete vezes consecutivas. Foram acrescentados 100 uL do substrato (TMB Substrate Reagent Set, BD Pharmingen, cat. N. 555214) em cada placa e esta foi incubada em

temperatura ambiente por 30 minutos com a placa coberta em papel alumínio para a proteção de luz. Após meia hora, foram adicionados 50 uL de Solução de Parada (2N de H_2SO_4) e seguiu-se imediatamente para leitura em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 450 nm.

V. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em células de baço e linfonodos de camundongos por Citometria de Fluxo

V.1.1. Determinação das subpopulações de linfócitos T nas células esplênicas e nos linfonodos poplíteos pela citometria de fluxo

O preparo das células esplênicas e dos linfonodos foi realizado conforme item IV.1.1. A análise da população de células T foi realizada conforme metodologia de Fedeli *et. al.*, (2010). Brevemente, os linfócitos, aproximadamente 1×10^6 células (500 μ L da suspensão), foram transferidos para *ependorfs* de 1,5 mL e fixados em formoldeído 1% em PBS, por 30 minutos, a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e lavado duas vezes com PBS. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 100 μ L de PBS estéril e feito bloqueio com 5% de soro normal de coelho por 15 minutos a 4°C. A suspensão de células foi então incubada com anticorpos monoclonais anti-CD4 (FITC – *Fluorescein isothiocyanate*), anti-CD8b (PE - *Phycoerythin*) e anti-CD3 (PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein*, também nomeado *TriColour*, *Cychrome*, PE-Cy5) de camundongos (BD Pharmingen, Cats. N. BD553650, BD550798 e BD555276, respectivamente). Uma alíquota de células de cada órgão serviu como controle isotípico negativo da reação, com a finalidade de eliminar fluorescências inespecíficas no momento da leitura, por isso elas não foram tratadas com nenhum dos anticorpos. A incubação com os anticorpos foi realizada na ausência de luz durante 1 hora, a 4°C. Em seguida, o material foi submetido a duas lavagens com PBS no intuito de eliminar anticorpos não ligados. O pellet final foi ressuspenso em 200 μ L de PBS-Formaldeído 1% em tubos-teste de poliestireno, específicos para o aparelho de citometria (BD Pharmingen, Cat. N. 352008) e mantidos em geladeira coberto com papel alumínio, a fim de se evitar exposição à luz, pois as leituras de cada grupo foram realizadas na Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob supervisão da Profa. Dra. Lúcia Faccioli e de sua técnica Fabiana Rosseto Morais. As preparações celulares foram analisadas no citômetro de

fluxo FACScanto (Becton, Dickison and Company; San Jose, CA, USA) (20.000 eventos por amostra). A seleção das subpopulações celulares encontradas nas diferentes amostras analisadas foi possível por meio de protocolos de aquisição pré-estabelecidos (BYRNE *et. al.*, 2000).

V.1.2. Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo

Na Figura 2, está a representação esquemática das células do linfonodo dos camundongos do grupo G2, das análises da reatividade de anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. Inicialmente, foi feito o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente (gate – P2) à população celular de interesse (linfócitos) através das características de tamanho (FSC) *versus* granululosidade (SSC). A partir do *gate* selecionado, fez-se a análise das amostras pelo cálculo de porcentagem ou intensidade de marcação (MIF), sendo este último representado pelos histogramas.

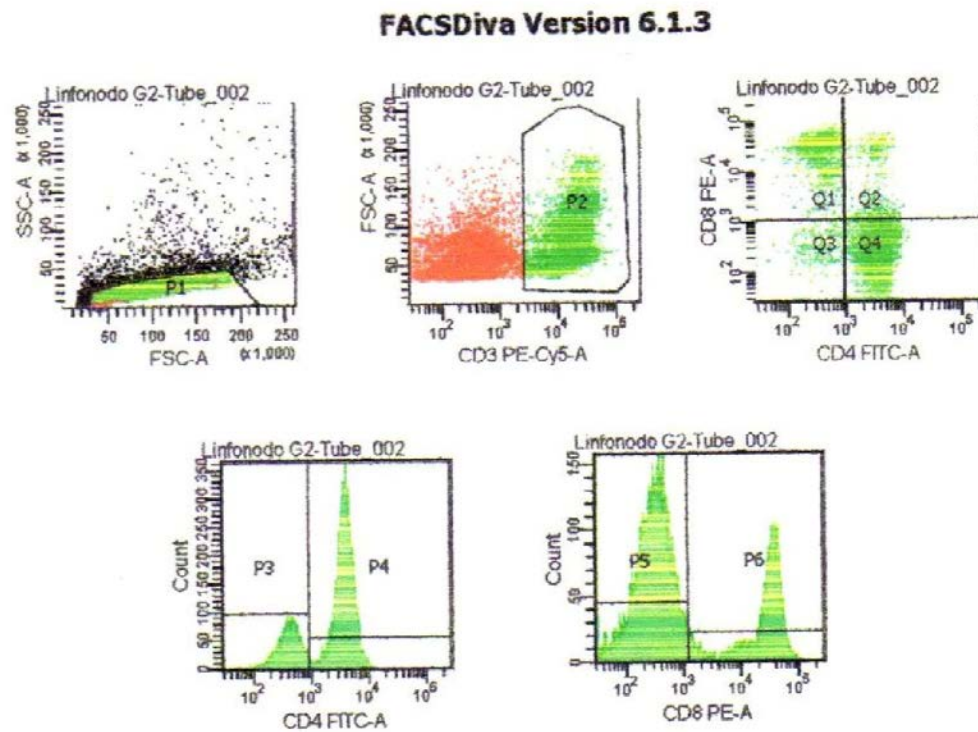


Figura 2. Representação esquemática para seleção da população de células de interesse de linfonodo do grupo G2.

VI. Análise Histopatológica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos

VI.1.1. Análise Histopatológica

Foram colhidos o linfonodo poplíteo e fragmentos de baço para análise em microscopia de luz. O preparo das amostras de tecido e confecção das lâminas está descrito no item II.1.4.

O baço foi avaliado de acordo com o padrão e intensidade da resposta inflamatória. A avaliação dos tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório esplênico (plasmócitos, macrófagos, linfócitos) foi feita por escores:

- 0 – Ausente
- 1 – Discreta (de uma a quinze células)
- 2 – Moderada (de quinze a trinta células)
- 3 – Acentuada (mais de trinta células)

Para o linfonodo considerou-se a reação celular predominante (reatividade linfoide, granulomas e plasmocitose), sendo o escore para:

Reatividade Linfoide (Linfócitos)

- 0 – Atrofia Linfoide
- 1 – Não Reativo
- 2 – Discreta Reatividade
- 3 – Moderada Reatividade
- 4 – Acentuada Reatividade

Granulomas (macrófagos) e Plasmocitose (Linfócitos B reativos)

- 0 – Sem alteração
- 1 – Discreta
- 2 – Moderada
- 3 – Acentuada

VII. Análise imuno-histoquímica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos

VII.1.1. Análise Imuno-histoquímica

O procedimento geral para os anticorpos anti-MAC387, anti-HLA-DR, cadeia α e anti-iNOS foi: desparafinização dos cortes de baço e linfonodos em estufa a 60°C / 1 hora e dois banhos em xilol por 10 minutos cada. Após essa etapa, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de álcool, até um banho em água destilada. Posteriormente, fez-se a recuperação antigênica (Tabela 1), o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura e o bloqueio das reações inespecíficas (Protein Block, Dakocytomation, cód. X0909), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários, cada um com sua diluição e tempo de incubação específico (Tabela 1). Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (Spring). Entre cada um dos passos descritos fizeram-se banhos em água destilada e em solução salina tamponada, pH 7,4. Para a visualização da reação, utilizaram-se os cromógenos DAB (3,3-diaminobenzidina – Spring), contra-coloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com Entellan Novo (Merck, Germany). O procedimento para os anticorpos anti-CD79, anti-CD4, anti-CD8 e anti-MHC I foi semelhante ao descrito acima, com a diferença de que o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se a mesma solução citada, foi realizado após a incubação com o anticorpo primário, seguido então de incubação com anticorpo secundário e demais passos subsequentes.

Tabela 1. Recuperação antigênica e diluições e tempos dos anticorpos primários utilizados nos cortes de baço e linfonodos de camundongos BALB/c.

Anticorpos primários	Células imunomarcadas	Espécies de origem	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação
Anti-MAC387	Macrófagos	Mouse monoclonal (MCA 874G, AbD Serotec, cód. Batch 1209)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:3500	18 horas (4°C)
Anti-CD79 alpha, B-cell	Linfócitos B	Mouse and Human Monoclonal (Thermo Scientific, cód. MA5-14556)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ²	1:3000	18 horas (4°C)
Anti-HLA-DR, cadeia α	Células expressando MHCII	Human monoclonal (Dako, cód. M0746)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:200	2 horas (TA*)
Anti-iNOS da região C-terminal	Células expressando iNOS	Mouse, Human and Rat Polyclonal (Thermo Scientific, cód. PA5-16855)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:3000	2 horas (TA*)
Anti-CD4 região C-terminal conjugado a KLH	Linfócitos T CD4 ⁺	Mouse and Human Policlonal (Thermo Scientific, cód. PA5-11582)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ²	1:3000	18 horas (4°C)
Anti-CD8 região N-terminal conjugado a KLH	Linfócitos T CD8 ⁺	Mouse, Human and Rat Policlonal (Biorbyt, cód. Orb10325)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:500	18 horas (4°C)
Anti-HLA, cadeia α	Células expressando MHCI	Mouse monoclonal ERMP42 (Abcam, cód. Ab15680)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:500	18 horas (4°C)

1 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0; 2 – Solução de Tris-EDTA (EDTA - 4mM; Tris – 40mM), pH 9,0.

*TA – Temperatura ambiente.

Os controles negativos para as imunomarcações foram realizados com o diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário. E os controles positivos com tecidos, segundo os fabricantes de cada anticorpo.

A contagem das células foi realizada por porcentagem de células imunomarcadas, utilizando-se cinco campos microscópicos (Olympus, BX60), na objetiva de 40 x, utilizando-se o programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Figura 3). No baço, foram consideradas as regiões de polpa branca e polpa vermelha. No

linfonodo, foi feita pelas regiões medular e cortical. Em ambos, os órgãos, prevaleceram as regiões *hot spot* para captura das imagens, ou seja, nos locais onde havia maior quantidade de células imunomarcadas. A partir dos valores obtidos nesses campos, fez-se uma média da porcentagem de células imunomarcadas por fragmentos de tecido de cada animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo experimental (G1, G2, G3 e G4).

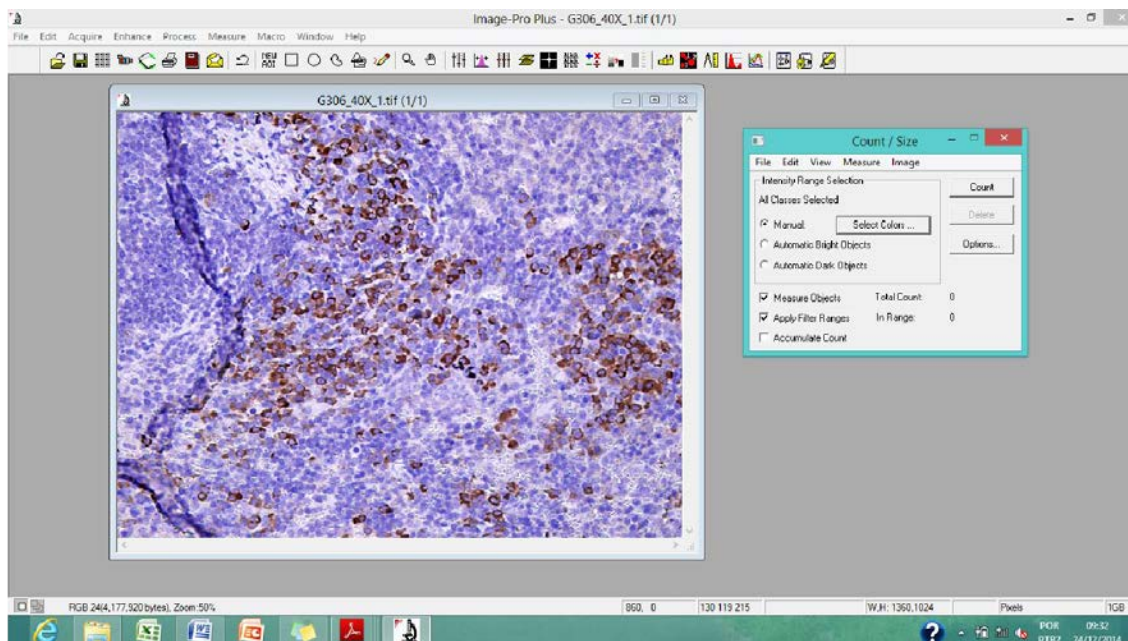


Figura 3. Captura Digital de Imagem. Imagem capturada com a utilização do programa Image Pro Plus versão 4.5 e análise da seção histológica (imuno-histoquímica anti-iNOS, 40X).

VII.1.2. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste estatístico One Way Anova, e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e as diferenças entre grupos para cada anticorpo pelo teste de comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). As análises foram feitas no programa Graphpad Prism (versão 5.01).

VIII. Avaliação da expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 pela PCR em Tempo Real

VIII.1.1. Extração de RNA total

Conforme anteriormente mencionado, as amostras de tecido de baço e linfonodo foram acondicionados em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, contendo 300 μ L de RNALater – RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Cat. N. 76104). A extração de RNA total de baço e linfonodo foi realizada com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, EUA, catálogo n. 74104), seguindo-se as orientações do fabricante. O RNA total obtido de todas as amostras foi dosado no espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) a 260 e 280nm. Essas amostras foram estocadas a -20°C, até o momento da realização da transcrição reversa do RNAm.

VIII.1.2. RT-PCR (Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de RT-PCR foi realizada utilizando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA. Catálogo n. 205311) para obtenção de cDNA a partir de RNAm, tendo o cuidado de sempre utilizar a mesma quantidade de 1 μ g de RNA total para todas as amostras. O cDNA, por sua vez, foi utilizado como molde na técnica de PCR em Tempo Real, com o objetivo de determinar o perfil de expressão das citocinas de interesse, nos dois órgãos dos animais dos quatro grupos experimentais. O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

Os genes da β -actina e do GAPDH foram inicialmente selecionados por serem genes constitutivos, ou seja, são expressos de forma contínua, independentemente de estímulos internos ou externos, por todas as células do organismo. Para validar qual seria o melhor controle interno normalizador para esse experimento, utilizou-se o *software* geNorm (VANDESOMPELE *et. al.*, 2002). Esse programa calcula, automaticamente, uma medida de estabilidade de expressão para cada gene-controle em um dado grupo de amostras. Esse programa também aponta o número mínimo de genes necessários para uma normalização acurada dos dados,

já que os próprios autores desse programa indicam a utilização de dois ou mais genes para a normalização ao invés de apenas um.

VIII.1.3. Produção de plasmídeos para utilização na técnica de PCR em Tempo Real.

Os plasmídeos, DNA circulares geneticamente modificados capazes de incorporar em seu DNA um gene, ou fragmento deste, tiveram a única finalidade, nesse caso, de avaliar a eficiência das reações de PCR em Tempo Real, através da construção de curvas-padrão. Os plasmídeos, contendo fragmentos de gene para as citocinas IL-10, IL-4 de camundongos, foram adquiridos pela empresa IDT[®] (Integrated DNA Technologies[®]). No entanto, para as citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α , assim como para os genes de referência, GAPDH e β -actina, foram construídos os plasmídeos no próprio laboratório, e a metodologia está descrita abaixo. Utilizou-se o cDNA para iniciar a produção desses plasmídeos.

VIII.1.4. Amplificação dos fragmentos de DNA a partir dos cDNAs pela PCR convencional

Foi feito um *pool* de cDNA das diferentes amostras para cada órgão e esse *pool* foi utilizado como molde para a realização da PCR convencional para cada citocina de interesse, assim como para os genes de referência. A sequência de DNA de cada gene de interesse inserido foi amplificada pela técnica da PCR convencional, utilizando-se os pares de nucleotídeos descritos por Overbergh (1999) com modificações. No quadro abaixo, estão representadas as sequências polinucleotídicas dos oligonucleotídeos, assim como as condições para a amplificação de cada citocina. Também estão representadas as sequências das sondas utilizadas posteriormente na PCR em Tempo Real.

Foram realizados diferentes protocolos da reação de amplificação, nos quais variou-se a temperatura de anelamento (gradiente de temperatura) de 50°C a 65°C (ver Quadro 2). As reações de amplificação para as citocinas foram realizadas, utilizando-se um volume total de 25 μ L, sendo: 1 μ L da amostra de cDNA de tecido

de baço ou linfonodo, 2,5 µL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 200 mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 µL de cada oligonucleotídeo diluído a 10 pmol/mL (IDT – Integrated DNA Technologies), 1U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen) e água q.s.p. As reações foram conduzidas em termociclador (MJ Research - PTC 200) e consistiram em um ciclo de 94°C por 10 minutos, 39 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto amplificado foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0%, corado com brometo de etídio (0,1 µl/mL) em tampão de corrida TEB (89mM Ácido bórico, 89 mM Tris-acetato, 2,5mM EDTA, pH final de 8,0). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50 mA, durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100 bp ladder, Fermentas). O resultado foi visibilizado e analisado através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene).

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores (Overbergh *et. al.* 1999) utilizados na PCR convencional e, na PCR em Tempo Real, sondas fluorogênicas, assim como nos seus ciclos, as temperaturas de anelamento e tamanho do produto esperado da amplificação dos cDNAs das citocinas de interesse, assim como dos genes endógenos (β – actina e GAPDH) e para amplificação de genes do gênero *Leishmania*.

Alvo	Iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Produto (pb)
IL-2	5' – CCT GAG CAG GAT GGA GAA TTA CA – 3' (FW) 5' – TCC AGA ACA TGC CGC AGA G – 3' (RV) Sonda 5' – CCC AAG CAG GCC ACA GAA TTG AAA G – 3'	60	141
IFN-gama	5' – TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA – 3' (FW) 5' – TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG – 3' (RV) Sonda 5' – TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG – 3'	55,3	92
TNF-alfa	5' – CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A – 3' (FW) 5' – TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC – 3' (RV) Sonda 5' – CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA – 3'	53	175
β – Actina	5' – AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC – 3' (FW) 5' – CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT – 3' (RV) Sonda 5' – CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC – 3'	51	148
GAPDH	5' – TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC – 3' (FW) 5' – GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA – 3' (RV) Sonda 5' – TGC ATC CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG – 3'	60	236

As sondas fluorogênicas são ligadas ao FAM na porção 5' e ligadas ao TAMRA na porção 3'. Todas as seqüências foram obtidas da base de dados Genbank. IL (interleucina); IFN- γ (interferon gama); TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa); GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

VIII.1.5. Purificação do fragmento gênico amplificado por PCR

Os produtos da PCR visibilizados no gel de agarose, conforme descrito anteriormente, foram removidos e o DNA purificado, utilizando-se o Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Cat # K0513), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a determinação do peso do fragmento de gel (fragmentos de 0,2 a 0,25 gramas por microtubo), foram adicionados 4,5 volumes (cerca de 900 μ L) da solução de *Binding Buffer*, mais 0,5 volume (cerca de 100 μ L) do TBE *conversion*, seguido de incubação a 55° C até a completa dissolução da agarose. Posteriormente, adicionou-se a resina de sílica e, após incubação a 55°C por 5 minutos, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm, durante 1 minuto (Eppendorf 5415R), e o DNA lavado com a solução *Washing Buffer* por três vezes. Após a última lavagem, o *pellet* ficou secando em temperatura ambiente por cerca de 1 hora ou até não visualizar resquício de etanol no microtubo. O precipitado foi então

dissolvido em 10 μ L de água com agitação no vórtex e incubado por 5 minutos a 55° C. Após nova centrifugação, o sobrenadante, aproximadamente 9 μ L, foi transferido para um novo microtubo de 0,2 mL. Esse material foi logo dosado e, imediatamente, seguiu-se o protocolo de reação de ligação no vetor pGEM T-Easy.

VIII.1.6. Quantificação do fragmento purificado

Após a purificação, a concentração de DNA foi obtida, usando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA).

VIII.1.7. Vetor de clonagem pGEM-T Easy

O vetor utilizado para a confecção dos clones foi o vetor de clonagem em *Escherichia coli* pGEM-T Easy Vector System I (Promega), cujas características e estruturas principais encontram-se expostas na Figura 4. Esse vetor é linearizado no sítio *Eco* RV, e duas timinas são adicionadas na terminação 3' das duas extremidades. Tal procedimento aumenta a eficiência de ligação com produtos de PCR, principalmente quando se utilizam certas polimerases termoestáveis, como a Taq DNA Polimerase Recombinante, que adiciona adenina na terminação 3' em parte significativa dos produtos de PCR.

O vetor de clonagem pGEM-T Easy possui a marca de seleção *AMP* (ampicilina).

C. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

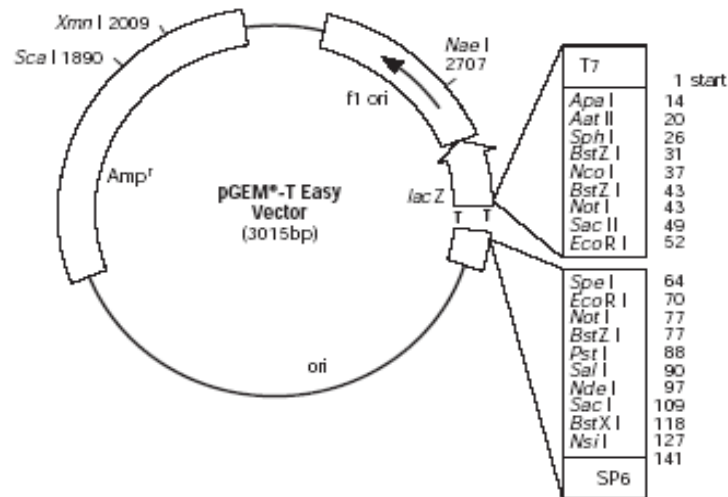


Figura 4. Mapa físico do vetor de clonagem em *E. coli* pGEM-T Easy (Promega)

VIII.1.8. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM-T Easy

A clonagem dos fragmentos com o vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector Systems e as reações foram executadas conforme indicação do kit. A quantificação das amostras de DNA extraídas dos géis de agarose com o Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Cat # K0513) foi realizada no NanoDrop. As concentrações de DNA nas amostras foram de 50 ng/μL a 80 ng/μL. As concentrações de DNA e vetor a serem utilizadas na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter, ao final, uma relação inserto: vetor de 3:1 com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Relação} = \text{ng do inserto}$$

Inserto : vetor

A reação de ligação do DNA de interesse com o vetor, de volume final 10 μL, consistiu de 3 μL de inserto, 5 μL de tampão da enzima, 1 μL do vetor pGEM-T Easy, 1 μL da enzima T4 Ligase. As soluções foram misturadas e incubadas a 4°C durante a noite para obtenção do número máximo de transformantes.

VIII.1.9. Transformação das células competentes de *Escherichia coli* One Shot Match 1™ T1^R

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar células competentes *E. coli* One Shot Match 1™ T1^R Chemically Competent Cells (Invitrogen Cat # C8620-03) ($10^9 - 10^{10}$ cfu/ng de DNA). Em gelo, 10 μ L, ou seja, o volume total da ligação do pGEM, descrita anteriormente, foi misturado a 50 μ L de células competentes One Shot Match 1™ T1^R ($10^9 - 10^{10}$ cfu/ng de DNA). A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, foi efetuado o choque térmico das células em banho de água a 42° C, por 2 minutos. Foram adicionados, então, 250 μ L de meio Luria Bertani (LB) (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; água destilada q.s.p. 100 mL) às células, as quais foram incubadas por uma hora a 37° C, com agitação de 100 rpm. A solução de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; 1,2 g de Agar; água destilada q.s.p. 100 mL) com 100 μ g/mL de ampicilina para o vetor pGEM. As placas para o vetor pGEM foram preparadas com 0,026% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) e 0,82 mM IPTG, para a diferenciação dos clones recombinantes, que ficam brancos, diferente dos clones sem inserto, que ficam azuis. Após incubação a 37° C por até 24 horas foi realizada a análise de clones transformantes.

VIII.1.10. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina)

As colônias de bactérias, contendo o inserto, foram transferidas para tubos cônicos para centrifuga de 15 mL, contendo 5 mL de meio líquido LB e 100 μ g/mL de ampicilina. Após crescimento a 37° C, sob agitação de 250 rpm, por 12 horas, as amostras foram submetidas à extração de DNA plasmidial, conforme descrito abaixo.

Para a extração do DNA plasmidial, foi utilizado o Método da Lise Alcalina (SAMBROOK *et. al.*, 2001). Os tubos, contendo as bactérias em meio líquido, foram incubados por 12 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Os precipitados foram coletados por centrifugação e a eles foram adicionados 100 μ L de solução Glicose-EDTA-Tris HCL (50 mM de glicose; 10 mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 25 mM de Tris-

HCL 1M pH 8,0 e água destilada q.s.p. 100 mL). Após homogeneização, foram adicionados 200 µL da solução de lise (1mL de NaOH 1N, 500 µL de SDS 10%, água milli-Q autoclavada q.s.p. 5 mL), a mistura foi por inversão, e as amostras foram deixadas em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3M, as amostras foram misturadas, deixadas no gelo novamente por 5 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm (Sorvall Legend Mach 1.6R), por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante (400 µL) foi transferido para um novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, misturado e colocado no *freezer* -80°C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70%, e as amostras foram submetidas à agitação até o descolamento do precipitado. Foi feita centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente, desprezou-se o sobrenadante, e os tubos foram secos em banho-seco à 45°C por aproximadamente 40 minutos. Foram adicionados 200µL de RNase (200µg/mL), e as amostras foram deixadas em banho-maria a 37°C por 2 horas. Após o banho, adicionaram-se 50 µL de fenol:clorofórmio (v/v). A mistura foi homogeneizada em agitador por 1 minuto e centrifugada conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com 10 µL de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200 µL de etanol absoluto. Após 15 minutos mantido à temperatura de -80°C, a mistura foi novamente centrifugada e, dessa vez, o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em banho-seco a 45°C, por aproximadamente, 30 minutos e diluído em 30 µL de água ultrapura. No momento, esse material foi submetido a sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia (FCAV- UNESP). O sequenciamento foi realizado pelo método automatizado, baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER *et. al.*, 1977). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada uma das seis construções de DNA plasmidial pGEM T-Easy, contendo o fragmento de cada citocina de interesse, assim como os pares de oligonucleotídeos iniciadores para fragmento de *Leishmania*, foram aqueles mesmos descritos no Quadro 2.

VIII.1.11. Análise das similaridades de sequências obtidas pelo BLAST

Por meio do sequenciamento genético dos plasmídeos, seguido da análise de identidade por meio do programa BLAST, foi observada similaridade com as sequências do Genbank para a espécie *Mus musculus*.

VIII.1.12. Construção de Curvas-padrão para a PCR em Tempo Real

A sensibilidade dos ensaios, assim como sua eficiência, foi testada com os plasmídeos contendo as sequências do gene-alvo, específicas para cada citocina, usando-se diluições seriadas na base 10. Foram realizadas diluições seriadas com o objetivo de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial, contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). O número de cópias do plasmídeo foi determinado de acordo com a fórmula ($X \text{ g}/\mu\text{L DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo em pares de base} \times 660] \times 6.022 \times 10^{23} \times \text{cópias do plasmídeo}/\mu\text{L}$) (PRAKASH *et al.*, 2009).

VIII.1.13. PCR em Tempo Real

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada em um volume final de $10 \mu\text{L}$, o qual continha $5 \mu\text{l}$ de Tampão 2X concentrado (IQ multiplex powermix, Bio-Rad, cat. # 172-5848), $1 \mu\text{l}$ de PrimeTime Assay 10X concentrado, específico para cada citocina (PrimeTime Std qPCR Assay, IDT®, USA), $3 \mu\text{l}$ de água livre de DNase e RNase e $1 \mu\text{l}$ de cDNA. A reação aconteceu em aparelho CFX-96 (Bio-Rad), sendo utilizadas placas de 96 poços (Low 96-well Clear, cat. # MLL9601, Bio-Rad) e adesivos (Microseal 'B' Film, cat. # MSB1001, Bio-Rad). Para cada citocina e gene endógeno foi adquirido PrimeTime Assay específico. Esse material contém os *primers* e sondas específicos para cada citocina, num mesmo tubo, liofilizados. As sondas específicas tinham marcação fluorescente do tipo FAM na extremidade 5' e o *quencher* TAMRA na extremidade 3'. As condições de reação foram de 95 por 3 minutos, seguidos de 39 ciclos de 95 por 15 segundos e 55 por 1 minuto. Para cada

reação, as amostras eram processadas em duplicata. Os controles negativos consistiram de água ultrapura autoclavada no lugar de cDNA, e o controle positivo consistiu nas curvas-padrão utilizadas em cada reação. Foram utilizados dois genes de referência, o β -actina e o GAPDH. Após análise, utilizando-se o programa geNorm, optou-se por utilizar apenas o GAPDH como gene de referência. O resultado da amplificação foi utilizado para normalizar a amplificação e utilizou-se como calibrador o grupo controle G4. A eficiência da reação foi feita por diluições de cada plasmídeo, conforme mencionado no item VIII.1.3. A quantificação relativa foi feita através da equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo o $\Delta C_T = C_T$ (alvo) – C_T (controle gene de referência) e o $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) – ΔC_T (calibrador) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

VIII.1.14. Análise Estatística

Foi utilizado o programa Graphpad Prism (versão 5.01) para a realização destas análises e construção dos gráficos. Utilizou-se a Análise de Variância One Way e o teste de Bonferroni. Quando a homogeneidade das variâncias não foi atendida, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis.

IX. Carga Parasitária de *L. chagasi* nas amostras de tecido dos camundongos

IX.1.1. Extração de DNA a partir de baço de camundongos para detecção de infecção

Para as amostras de baço dos animais dos grupos G1 e G3, realizou-se a extração de DNA apenas do baço coletado no dia específico de eutanásia para cada grupo, utilizando-se o DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (cat. nº 69506, Qiagen[®]). Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de *Leishmania chagasi* mantidas em cultivo. A concentração de DNA obtida foi calculada em espectrofotômetro supersensível Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA).

IX.1.2. Amplificação do DNA de *L. chagasi* pela PCR convencional

Os *primers* utilizados para PCR específicos para o complexo *Donovani* foram os oligonucleotídeos MC1 e MC2, conforme descrito por Cortes *et. al.*, (2004). Abaixo, estão representadas as sequências polinucleotídicas dos oligonucleotídeos.

- MC1 (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3')
- MC2 (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3')

A reação de amplificação utilizada para um volume total de 25 µL foi de: 5 µL da amostra de DNA extraída, 2,5 µL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 10 mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 2,5 µL de cada oligonucleotídeo diluído a 10 pmol/mL (Invitrogen), 1U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen) e água q.s.p. A reação foi conduzida em termociclador (MJ Research - PTC 200) e consistiu de um ciclo de 94°C por 2 minutos, 29 ciclos de desnaturação a 94° C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto amplificado (447 pares de base) foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0%, corado com brometo de etídio (0,5µl/mL) em

tampão de corrida TEB (89mM Ácido bórico, 89 mM Tris-acetato, 2,5mM EDTA, pH final de 8,0). A eletroforese foi realizada a 100V/ 50mA, durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen). O resultado foi visibilizado e analisado através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene).

IX.1.3. Amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR em Tempo Real

Com as amostras de DNA extraídas dos grupos G1 e G3, realizou-se o teste de PCR em Tempo Real, utilizando-se as condições citadas abaixo.

A reação de amplificação utilizada para um volume total de 25 µL foi de: 5 µL da amostra de DNA extraída, 2,5 µL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 10 mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 2,5 µL de cada oligonucleotídeo diluído a 10 pmol/mL(Invitrogen), 1U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen), 1 µL de Syto9, a 5 µM (Invitrogen, cat. n. S34854) e água q.s.p. A reação foi conduzida em aparelho de Tempo Real (CFX96, Bio-Rad). Os *primers* utilizados para a PCR de *Leishmania* spp (L1 e L2) (Quadro 2), foram aqueles descritos por MICHALSKY *et. al.* (2002). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador com ciclos de: 1 ciclo: D: 94° C (5 min); A: 65°C (30 seg); E: 72°C (30 seg) e 40 ciclos: D: 94°C (30 seg); A: 65°C (30 seg); E: 72°C (30 seg); E_{final}: 72°C (5 min).

Para a quantificação da carga parasitária nos tecidos dos animais, através do PCR em Tempo Real quantitativo, foi construída um plasmídeo, conforme metodologia descrita anteriormente (itens de VIII 1.4 a VIII 1.10), utilizando-se DNA de *L. chagasi* extraído de meio de cultura axênico.

Quadro 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real e na convencional para a construção do plasmídeo, assim como seu ciclo, a temperatura de anelamento e tamanho do produto esperado da amplificação do gene *Leishmania* spp.

Alvo	Iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Produto (pb)
L1L2	5' – GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA – 3' 5' – GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC – 3'	65	120

IX.1.4. Análise Estatística

Utilizou-se o programa Graphpad Prism (versão 5.01) para a realização da análise e construção do gráfico e o teste não paramétrico, Mann-Whitney para comparar os grupos G1 e G3.

5. RESULTADOS

I. ELISA-teste – Detecção de anticorpos em soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*

I.2.1. Elisa-teste na detecção de anticorpos anti-*L. chagasi* e anti-A2-L nos soros dos cães

Foram obtidas 891 (n= 1.227) amostras de soro positivas pelo ELISA-teste, utilizando-se antígeno solúvel total de *L. chagasi* (máxima Densidade Óptica – DO – soro positivo = 3,402 e mínima DO soro negativo = 0,115). Resultados das DO no Anexo 1. Dessas 891 amostras positivas, 574 (64, 42%) foram soropositivas contra a proteína A2-L no ELISA indireto. O resultado das Densidades Ópticas (DO) de cada soro, contra a proteína A2-L, também encontra-se no Anexo 1 (DO soro positivo = 1,668 e DO soro negativo = 0,067). O ponto de corte para ambos foi de 0,282 no ELISA-teste.

III. RIFI e ELISA das amostras de soros dos camundongos

III.2.1. Elisa-teste utilizando o antígeno solúvel total de *L. chagasi* como antígeno na Detecção de Anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo

O resultado das Densidades Ópticas (DO) de cada soro está na Tabela 2. Conforme se pode verificar, todos os animais dos grupos 2 (inoculados com a proteína A2-L) e 4 (grupo controle) foram negativos, enquanto os animais do grupo 1 (inoculados com *L. chagasi*) foram todos positivos. No entanto, nem todos os animais do grupo 3 (inoculados com a proteína A2-L e desafiados com o parasita), foram positivos pelo ELISA-teste. O ponto de corte para IgG total, IgG1 e IgG2a foi, respectivamente, de 0,228; 0,279 e 0,282 no ELISA-teste. A avaliação dos resultados sobre a proporção IgG2a/IgG1, observada para os grupos G2, G3 e G4, foi de 0,89; 0,60 e 1,15, respectivamente, enquanto o grupo G1 ficou em 0,44. Quanto mais próximo a 1, pode-se dizer que houve uma produção similar de ambos, IgG2a e IgG1.

Tabela 2. Resultados das densidades ópticas dos soros de camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais, avaliados pelo ELISA-teste, utilizando-se o antígeno solúvel total (AST) de *L. chagasi*.

Conjugado	Animal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
IgG		0,898	0,107	0,129	0,101
IgG1	1	0,632	0,267	0,247	0,181
IgG2a		0,266	0,179	0,249	0,266
IgG		0,388	0,102	0,380	0,081
IgG1	2	0,503	0,128	0,797	0,134
IgG2a		0,328	0,126	0,541	0,160
IgG		0,407	0,111	0,238	0,100
IgG1	3	0,452	0,133	0,333	0,146
IgG2a		0,180	0,118	0,300	0,166
IgG		1,002	0,110	0,336	0,097
IgG1	4	0,603	0,109	0,395	0,101
IgG2a		0,267	0,118	0,261	0,162
IgG		0,643	0,123	0,175	0,090
IgG1	5	0,580	0,125	0,408	0,120
IgG2a		0,188	0,174	0,274	0,179
IgG		0,658	0,089	0,239	0,097
IgG1	6	0,483	0,124	0,582	0,117
IgG2a		0,183	0,111	0,256	0,158
IgG		0,714	0,115	0,238	0,097
IgG1	7	0,737	0,220	0,309	0,166
IgG2a		0,299	0,147	0,189	0,122
IgG		0,282	0,105	0,465	0,110
IgG1	8	0,439	0,136	1,042	0,137
IgG2a		0,235	0,124	0,396	0,115
IgG		0,475	0,119	0,303	0,115
IgG1	9	0,795	0,120	0,463	0,171
IgG2a		0,257	0,127	0,284	0,134
IgG		0,573	0,106	0,310	0,102
IgG1	10	0,512	0,159	0,500	0,132
IgG2a		0,374	0,138	0,288	0,163

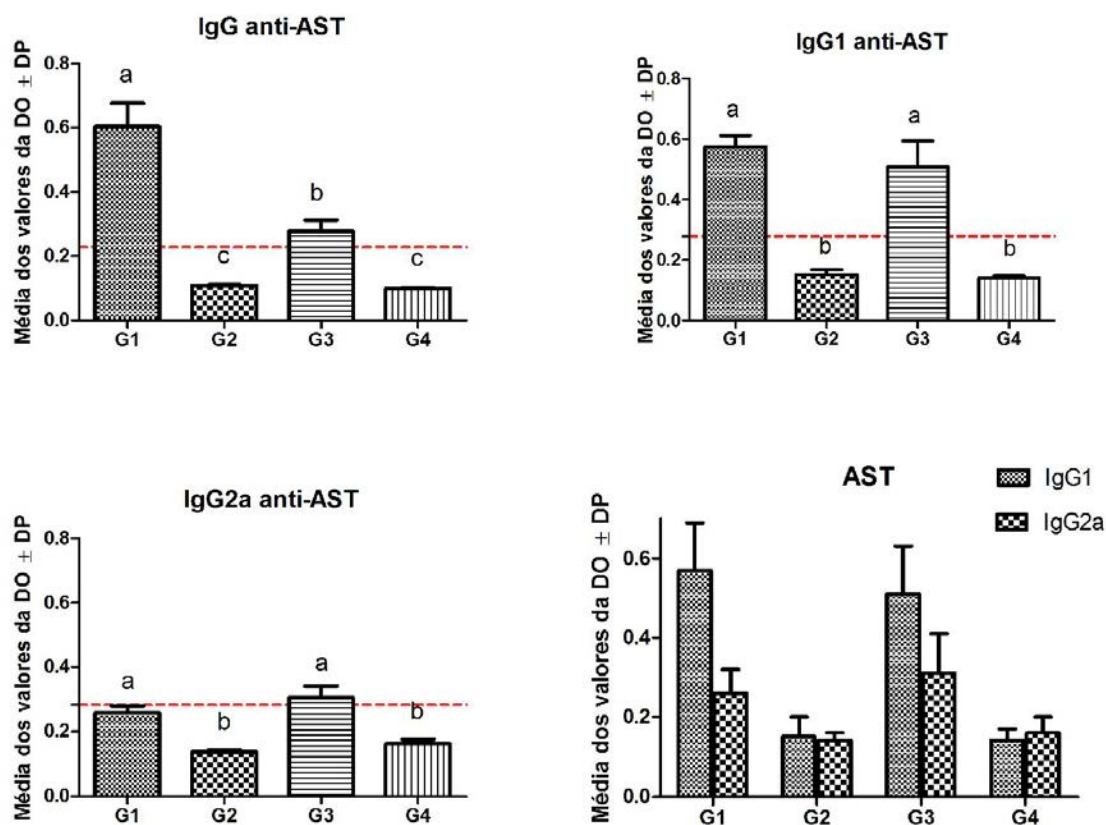


Figura 5. Média dos níveis de anticorpos específicos para antígeno solúvel total (AST) de *Leishmania* sp. (valores em Densidades Ópticas – DO) em soro de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculado com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Os resultados são os valores da média de cada grupo \pm Desvio Padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas por letras diferentes. O ponto tracejado em vermelho representa o ponto de corte de cada IgG (IgG = 0,228; IgG1 = 0,279 e IgG2a = 0,282).

III.2.2. Elisa-teste, utilizando-se a proteína recombinante A2-L como antígeno na Detecção de Anticorpos

O resultado das Densidades Ópticas (DO) de cada soro está apresentado na Tabela 3. Na padronização em bloco, a melhor diluição do soro reagente foi 1: 50 e a concentração de 2,5 ug/mL para a concentração do antígeno. Conforme se pode verificar, a maioria dos animais dos grupos 1 e 4 foram negativos, enquanto os

animais inoculados com a proteína A2-L (grupos 2 e 3) foram todos positivos, com altas DO. O ponto de corte para IgG total, IgG1 e IgG2a foi, respectivamente, de 0,218; 0,230 e 0,230 no ELISA-teste.

Tabela 3. Resultados das densidades ópticas dos soros de camundongos pertencentes aos quatro grupos experimentais, avaliados pelo ELISA-teste, utilizando-se a proteína recombinante A2-L como antígeno.

Conjugado	Animal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
IgG		0,068	0,784	1,170	0,171
IgG1	1	0,084	2,043	2,286	0,086
IgG2a		0,072	1,210	1,827	0,200
IgG		0,110	0,691	0,964	0,166
IgG1	2	0,220	2,046	2,261	0,106
IgG2a		0,092	0,811	1,515	0,231
IgG		0,122	0,816	0,829	0,116
IgG1	3	0,117	1,929	2,149	0,228
IgG2a		0,192	1,089	1,403	0,091
IgG		0,135	0,909	0,901	0,105
IgG1	4	0,225	2,119	2,019	0,230
IgG2a		0,137	0,979	1,419	0,086
IgG		0,126	1,052	0,813	0,120
IgG1	5	0,152	1,939	1,926	0,158
IgG2a		0,177	1,243	1,326	0,197
IgG		0,158	0,978	1,011	0,088
IgG1	6	0,230	1,831	2,034	0,083
IgG2a		0,149	1,260	1,388	0,117
IgG		0,093	0,997	1,055	0,159
IgG1	7	0,092	1,739	2,081	0,226
IgG2a		0,104	1,264	1,362	0,179
IgG		0,117	0,944	0,850	0,233
IgG1	8	0,193	1,832	1,883	0,222
IgG2a		0,173	1,171	1,157	0,220
IgG		0,149	1,036	0,995	0,136
IgG1	9	0,233	1,615	1,885	0,187
IgG2a		0,105	1,311	1,478	0,196
IgG		0,074	1,204	0,861	0,080
IgG1	10	0,084	1,786	2,006	0,115
IgG2a		0,068	1,403	1,157	0,082

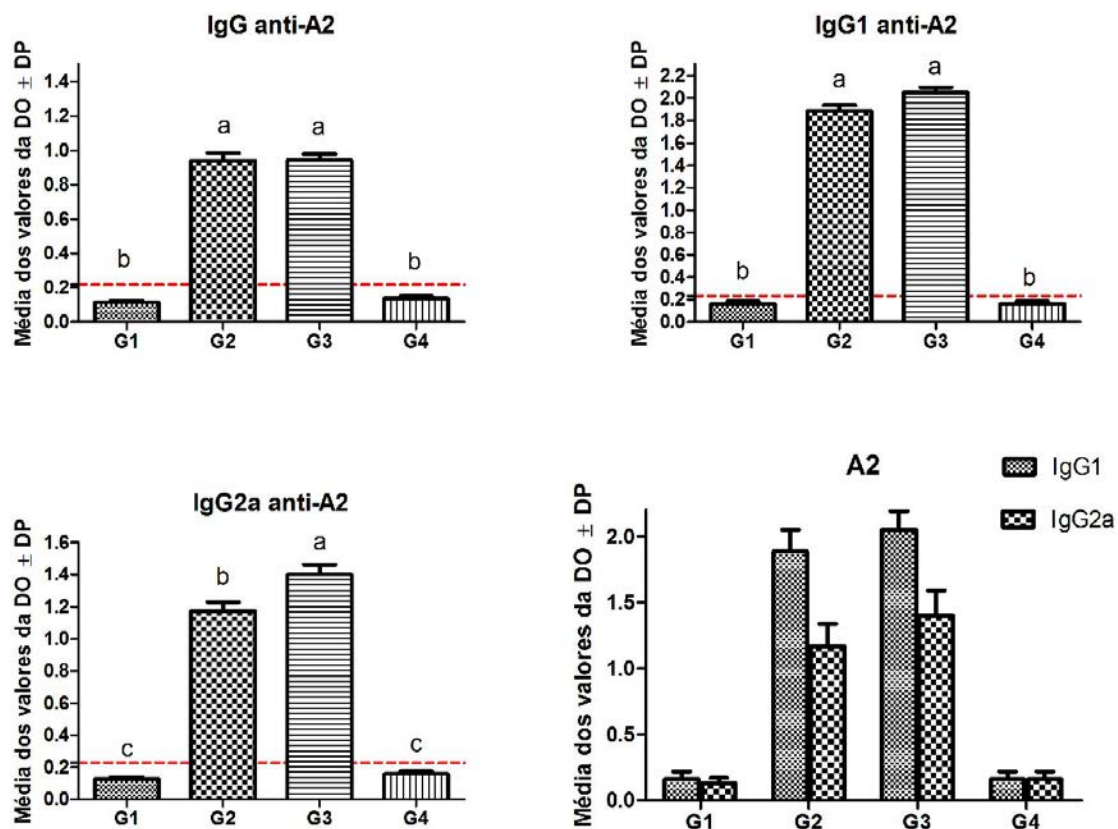
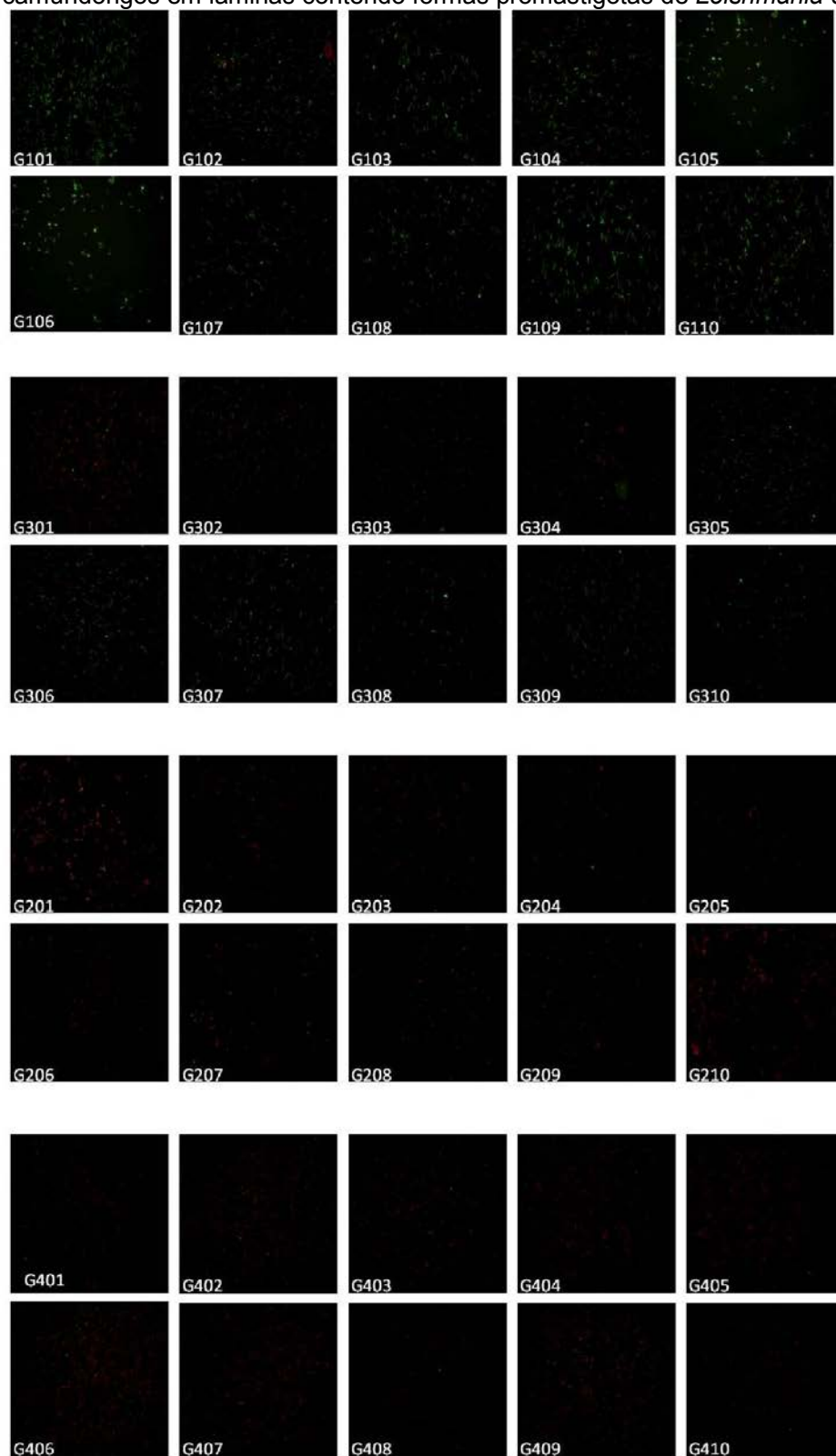


Figura 6. Média dos níveis de anticorpos específicos para a proteína recombinante A2-L (valores em Densidades Ópticas – DO) em soro de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculado com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). Os resultados são os valores da média de cada grupo \pm Desvio Padrão. O ponto tracejado em vermelho representa o ponto de corte de cada IgG (IgG = 0,218; IgG1 = 0,230 e IgG2a = 0,230).

III.2.3. RIFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Todos os soros dos camundongos dos grupos G1 e G3 foram positivos frente ao substrato antigênico de promastigotas de *L. chagasi*, enquanto todos os soros dos grupos G2 e G4 foram negativos (Figura 7).

Figura 7. Reação de imunofluorescência indireta das amostras de soro dos camundongos em lâminas contendo formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.



IV. ELISA de citocina dos sobrenadantes de células dos camundongos

IV.2.1. Dosagem de citocinas pelo ELISA

Na Tabela 4, foram apresentados os resultados da concentração de IFN- γ para as células de baço e de linfonodo em tempos e estímulos diferentes para cada grupo. Os resultados da concentração foram apresentados pela média de valores dos 10 animais/grupo \pm erro padrão de medidas. No baço, a produção de IFN- γ foi maior estatisticamente, quando estimulados pela ConA e pela proteína A2-L, em todos os grupos. No entanto, mesmo quando não houve estímulo, quem se destacou foi o grupo G1. Nas células do linfonodo, na ausência de estímulo, praticamente não houve níveis detectáveis dessa citocina. Porém, quando estimuladas com ConA e A2-L, destacaram-se os grupos G1 e G3. No geral, as concentrações de IFN- γ no baço foram maiores do que as concentrações obtidas no linfonodo.

Tempo	Grupos	IFN- γ _Baço			IFN- γ _Linfonodo		
		Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP	Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP
24 horas	G1	588,40 \pm 12,54 (aA)	853,60 \pm 12,54 (aB)	856,60 \pm 12,54 (aB)	0,0 \pm 15,24 (aA)	217,00 \pm 15,24 (aC)	686,5 \pm 15,24 (aB)
	G2	53,52 \pm 17,73 (bA)	209,90 \pm 17,73 (bB)	243,72 \pm 17,73 (bB)	47,9 \pm 15,24(aA)	4,2 \pm 15,24 (bA)	18,3 \pm 15,24 (bA)
	G3	1,50 \pm 14,02 (bA)	554,01 \pm 14,02 (cC)	918,86 \pm 14,02 (aB)	0,0 \pm 17,04 (aA)	6,16 \pm 17,04 (bA)	89,14 \pm 17,04 (cA)
	G4	174,10 \pm 12,54 (cA)	436,80 \pm 12,54 (dB)	396,10 \pm 12,54 (cB)	0,0 \pm 15,24 (aA)	0,0 \pm 15,24 (bA)	0,0 \pm 15,24 (cA)
48 horas	G1	669,70 \pm 12,54 (aA)	862,30 \pm 12,54 (aB)	863,90 \pm 12,54 (aB)	0,0 \pm 15,24 (aA)	350,4 \pm 15,24 (aC)	814,3 \pm 15,24 (aB)
	G2	44,34 \pm 17,73 (bA)	277,90 \pm 17,73 (bB)	293,90 \pm 17,73 (bB)	7,0 \pm 15,24 (aA)	4,8 \pm 15,24 (bA)	43,9 \pm 15,24 (bA)
	G3	1,50 \pm 14,02 (bA)	434,44 \pm 14,02 (cC)	864,52 \pm 14,02 (aB)	0,72 \pm 17,04(aA)	22,46 \pm 17,04 (bA)	203,27 \pm 17,04 (cB)
	G4	243,20 \pm 12,54 (cA)	451,60 \pm 12,54 (dB)	423,90 \pm 12,54 (cB)	0,0 \pm 15,24 (aA)	0,5 \pm 15,24 (bA)	15,1 \pm 15,24 (bA)
72 horas	G1	701,10 \pm 12,54 (aA)	864,20 \pm 12,54 (aB)	869,70 \pm 12,54 (aB)	0,39 \pm 15,24(aA)	430,9 \pm 15,24 (aC)	808,7 \pm 15,24 (aB)
	G2	48,54 \pm 17,73 (bA)	283,90 \pm 17,73 (bB)	301,90 \pm 17,73 (bB)	4,6 \pm 15,24 (aA)	2,4 \pm 15,24 (bA)	36,3 \pm 15,24 (bA)
	G3	0,70 \pm 14,02 (bA)	401,83 \pm 14,02 (cC)	848,21 \pm 14,02 (aB)	0,72 \pm 17,04(aA)	22,46 \pm 17,04 (bA)	214,14 \pm 17,04 (cB)
	G4	247,90 \pm 12,54 (cA)	459,00 \pm 12,54 (cB)	429,40 \pm 12,54 (cB)	0,0 \pm 15,24 (aA)	0,5 \pm 15,24 (bA)	19,9 \pm 15,24 (bA)

Tabela 4. Produção de IFN- γ (pg/mL) de células de baço e linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias \pm erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical) e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).

Na Tabela 5, estão os resultados da concentração de IL-2, para as células de baço e de linfonodo em tempos e estímulos diferentes para cada grupo. Nas células do baço, nota-se que o estímulo com a conA induziu aumento estatisticamente significativo da concentração de IL-2 em relação aos cultivos sem estímulo e aquele estimulado com a proteína A2-L. No entanto, o grupo G2, estimulado pela proteína A2-L, após 48 e 72 horas, produziu quantidades significativamente maiores dessa citocina. Nas células de linfonodos, o estímulo com a conA obteve aumento significativo de IL-2, enquanto, após 48 e 72 horas, os grupos G1, G2 e G3 também obtiveram um aumento, embora estatisticamente não significativo. No geral, as concentrações de IL-2 no linfonodo foram menores do que as concentrações obtidas no baço.

Tempo	Grupos	IL-2_Baço			IL-2_Linfonodo		
		Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP	Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP
24 horas	G1	43,10 ± 5,0 (aA)	51,60 ± 5,0 (aA)	227,20 ± 5,0 (aB)	0,00 ± 2,84 (aA)	5,50 ± 2,84 (aC)	224,90 ± 2,84 (aB)
	G2	11,70 ± 7,07 (abA)	38,00 ± 7,07 (abA)	191,50 ± 7,07 (bB)	5,50 ± 2,84 (aA)	7,80 ± 2,84 (aA)	114,0 ± 2,84 (bA)
	G3	5,03 ± 5,6 (bA)	7,73 ± 5,6 (bA)	60,79 ± 5,6 (cB)	5,03 ± 3,18 (aA)	5,03 ± 3,18 (aA)	25,71 ± 3,18 (cB)
	G4	1,99 ± 5,0 (bA)	5,30 ± 5,0 (bA)	156,40 ± 5,0 (dB)	0,00 ± 2,84 (aA)	0,00 ± 2,84 (aA)	119,20 ± 2,84 (bB)
48 horas	G1	66,10 ± 5,0 (aA)	47,80 ± 5,0 (aA)	207,1 ± 5,0 (aB)	2,90 ± 2,84 (aA)	25,60 ± 2,84 (aC)	211,10 ± 2,84 (aB)
	G2	28,70 ± 7,07 (abA)	110,90 ± 7,07 (bC)	228,7 ± 7,07 (aB)	6,30 ± 2,84 (aA)	13,20 ± 2,84 (abA)	164,40 ± 2,84 (bB)
	G3	5,03 ± 5,6 (bA)	12,23 ± 5,6 (cA)	45,5 ± 5,6 (bB)	5,03 ± 3,18 (aA)	5,93 ± 3,18 (bA)	50,89 ± 3,18 (cB)
	G4	26,50 ± 5,0 (bA)	23,10 ± 5,0 (acA)	157,9 ± 5,0 (cB)	1,10 ± 2,84 (aA)	2,90 ± 2,84 (bA)	143,30 ± 2,84 (dB)
72 horas	G1	54,50 ± 5,0 (aA)	48,50 ± 5,0 (aA)	229,40 ± 5,0 (aB)	7,10 ± 2,84 (aA)	30,20 ± 2,84 (aC)	225,6 ± 2,84 (aB)
	G2	31,8 ± 7,07 (abA)	93,90 ± 7,07 (bC)	179,10 ± 7,07 (bB)	5,50 ± 2,84 (aA)	12,50 ± 2,84 (bA)	154,3 ± 2,84 (bB)
	G3	6,83 ± 5,6 (bA)	12,23 ± 5,6 (cA)	26,17 ± 5,6 (cA)	5,03 ± 3,18 (aA)	5,93 ± 3,18 (bA)	46,4 ± 3,18 (cB)
	G4	16,90 ± 5,0 (bA)	13,00 ± 5,0 (cA)	155,70 ± 5,0 (bB)	0,50 ± 2,84 (aA)	0,50 ± 2,84 (bA)	129,4 ± 2,84 (dB)

Tabela 5. Produção de IL-2 (pg/ml) de células de baço e linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias ± erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical), e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).

Na Tabela 6, estão os resultados da concentração de TNF- α , para as células de baço e de linfonodo em tempos e estímulos diferentes para cada grupo. Nas células do baço, não foi estatisticamente significativa entre os estímulos, com exceção do grupo G1, estimulado com A2-L, após 24 horas. Entre os grupos, apesar de não serem estatisticamente diferentes, nota-se que apenas os grupos G1 e G2 produziram níveis detectáveis da citocina. Nas células do linfonodo, entre estímulos e entre grupos, não foram estatisticamente diferentes, apesar, novamente, de apenas os grupos G1 e G2 produzirem níveis detectáveis da citocina. A produção dessa citocina, tanto pelas células esplênicas quanto pelas células do linfonodo foi muito similar.

Tempo	Grupos	TNF- α _Baço			TNF- α _Linfonodo		
		Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP	Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP
24 horas	G1	9,3 \pm 4,74 (aA)	48,3 \pm 4,74 (aB)	37,6 \pm 4,74 (aA)	16,3 \pm 5,0 (abA)	16,3 \pm 5,0 (abA)	23,3 \pm 5,0 (abA)
	G2	29,4 \pm 6,7 (aA)	29,4 \pm 6,7 (abA)	29,4 \pm 6,7 (aA)	36,1 \pm 5,0 (aA)	29,4 \pm 5,0 (aA)	36,1 \pm 5,0 (aA)
	G3	0,0 \pm 5,3 (aA)	0,0 \pm 5,3 (bA)	0,0 \pm 5,3 (aA)	0,0 \pm 5,6 (bA)	0,0 \pm 5,6 (bA)	0,0 \pm 5,6 (bA)
	G4	0,0 \pm 4,74 (aA)	0,0 \pm 4,74 (bA)	0,0 \pm 4,74 (aA)	0,0 \pm 5,0 (bA)	0,0 \pm 5,0 (bA)	0,0 \pm 5,0 (bA)
48 horas	G1	37,6 \pm 4,74 (aA)	31,6 \pm 4,74 (aA)	23,3 \pm 4,74 (aA)	23,3 \pm 5,0 (abA)	29,3 \pm 5,0 (abA)	31,6 \pm 5,0 (aA)
	G2	29,4 \pm 6,7 (abA)	29,4 \pm 6,7 (abA)	29,4 \pm 6,7 (aA)	36,1 \pm 5,0 (aA)	29,4 \pm 5,0 (aA)	36,1 \pm 5,0 (aA)
	G3	0,0 \pm 5,3 (bA)	0,0 \pm 5,3 (bA)	0,0 \pm 5,3 (aA)	0,0 \pm 5,6 (bA)	0,0 \pm 5,6 (bcA)	0,0 \pm 5,6 (bA)
	G4	0,0 \pm 4,74 (bA)	0,0 \pm 4,74 (bA)	0,0 \pm 4,74 (aA)	0,0 \pm 5,0 (bA)	0,0 \pm 5,0 (cA)	9,9 \pm 5,0 (abA)
72 horas	G1	23,3 \pm 4,74 (aA)	31,6 \pm 4,74 (aA)	31,0 \pm 4,74 (aA)	31,6 \pm 5,0 (aA)	39,9 \pm 5,0 (aA)	23,3 \pm 5,0 (aA)
	G2	29,4 \pm 6,7 (aA)	29,4 \pm 6,7 (abA)	29,4 \pm 6,7 (abA)	29,4 \pm 5,0 (aA)	9,6 \pm 5,0 (bA)	162,7 \pm 5,0 (abB)
	G3	0,0 \pm 5,3 (aA)	0,0 \pm 5,3 (bA)	0,0 \pm 5,3 (bA)	0,0 \pm 5,6 (bA)	0,0 \pm 5,6 (bA)	0,0 \pm 5,6 (aA)
	G4	0,0 \pm 4,74 (aA)	34,9 \pm 4,74 (bA)	0,0 \pm 4,74 (bA)	0,0 \pm 5,0 (bA)	0,0 \pm 5,0 (bA)	0,0 \pm 5,0 (aA)

Tabela 6. Produção de TNF- α (pg/ml) de células de baço e linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias \pm erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical), e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados da concentração de IL-4 para as células de baço e de linfonodo em tempos e estímulos diferentes para cada grupo. Nas células do baço, apenas o estímulo com a conA foi maior estatisticamente nos grupos G1, G3 e G4. O grupo G2 foi o único grupo que não apresentou aumento na produção dessa citocina. Nas células do linfonodo, novamente o grupo G2 praticamente não produziu níveis detectáveis desta citocina. E, apenas o grupo G1, estimulado com conA apresentou maior concentração de IL-4. A produção dessa citocina tanto pelas células esplênicas quanto pelas células do linfonodo foram muito similares.

Tempo	Grupos	IL-4_Baço			IL-4_Linfonodo		
		Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP	Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP
24 horas	G1	2,50 ± 2,61 (aA)	2,50 ± 2,61 (aA)	48,8 ± 2,61 (aB)	2,47 ± 1,31 (aA)	2,50 ± 1,31 (aA)	16,20 ± 1,31 (aB)
	G2	0,00 ± 3,7 (aA)	14,50 ± 3,7 (abA)	5,50 ± 3,7 (bA)	9,80 ± 1,31 (acA)	30,20 ± 1,31 (bC)	0,00 ± 1,31 (bB)
	G3	16,94 ± 2,92 (aA)	23,35 ± 2,92 (bA)	39,38 ± 2,92(acB)	16,94 ± 1,46(bcA)	16,94 ± 1,46 (cA)	16,94 ± 1,46 (aA)
	G4	0,00 ± 2,61 (aA)	2,70 ± 2,61 (aA)	27,4 ± 2,61 (cB)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (bA)
48 horas	G1	2,50 ± 2,61 (abA)	2,50 ± 2,61 (aA)	37,21 ± 2,61(aB)	2,50 ± 1,31 (aA)	5,60 ± 1,31 (aA)	15,10 ± 1,31 (aB)
	G2	0,00 ± 3,7 (abA)	3,50 ± 3,7 (aA)	0,00 ± 3,7 (bA)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (bA)
	G3	16,94 ± 2,92 (abA)	16,94 ± 2,92 (aA)	26,56 ± 2,92 (acA)	16,94 ± 1,46 (bA)	16,94 ± 1,46 (bA)	16,94 ± 1,46 (aA)
	G4	0,00 ± 2,61 (aA)	4,10 ± 2,61 (aAB)	18,3 ± 2,61 (cB)	2,70 ± 1,31 (aA)	1,40 ± 1,31 (aA)	4,10 ± 1,31 (bA)
72 horas	G1	2,50 ± 2,61 (aA)	3,5 ± 2,61 (aA)	41,4 ± 2,61 (aB)	3,30 ± 1,31 (aA)	3,50 ± 1,31 (aA)	17,20 ± 1,31 (aB)
	G2	0,00 ± 3,7 (aA)	3,50 ± 3,7 (aA)	0,00 ± 3,7 (bA)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (aA)	0,00 ± 1,31 (bA)
	G3	16,94 ± 2,92 (aA)	16,94 ± 2,92 (aA)	42,58 ± 2,92 (aB)	16,94 ± 1,46 (bA)	16,94 ± 1,46 (bA)	16,94 ± 1,46 (aA)
	G4	13,70 ± 2,61 (aA)	13,90 ± 2,61 (aA)	22,7 ± 2,61 (cA)	5,40 ± 1,31 (aA)	5,40 ± 1,31 (aA)	12,20 ± 1,31 (aA)

Tabela 7. Produção de IL-4 (pg/ml) de células de baço e linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias ± erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical), e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).

Na Tabela 8, estão os resultados da concentração de IL-10, para as células de baço e de linfonodo em tempos e estímulos diferentes, para cada grupo. Nas células do baço, apenas os grupos estimulados pela A2-L foi maior estatisticamente. Entre os grupos, quem se destacou na produção dessa citocina foi o grupo G2, após estímulo pela proteína A2-L. Nas células do linfonodo, o grupo G3, estimulado pela proteína A2-L, também apresentou maior concentração de IL-10. A produção dessa citocina, após estímulos com A2-L e conA foi, em sua maioria, maior nas células esplênicas do que nas células do linfonodo.

Tempo	Grupos	IL-10_ Baço			IL-10_ Linfonodo		
		Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP	Sem estímulo pg/ml – EP	A2-L pg/ml – EP	ConA pg/ml – EP
24 horas	G1	29,42 ± 44,57 (aA)	329,40 ± 44,57 (aB)	72,3 ± 44,57 (aA)	29,4 ± 17,8 (aA)	58,0 ± 17,8 (abA)	20,4 ± 17,8 (aA)
	G2	137,30 ± 63,03 (aA)	1568,25 ± 63,03 (bB)	87,3 ± 63,03 (aA)	0,0 ± 17,8 (aA)	87,3 ± 17,8 (abA)	43,7 ± 17,8 (aA)
	G3	46,50 ± 49,83 (aA)	265,25 ± 49,83 (aA)	46,5 ± 49,83 (aA)	46,5 ± 19,9 (aA)	140,25 ± 19,9 (aA)	77,75 ± 19,9 (aA)
	G4	0,0 ± 44,57 (aA)	617,1 ± 44,57 (cB)	205,7 ± 44,57 (aA)	0,0 ± 17,8 (aA)	0,0 ± 17,8 (bA)	0,0 ± 17,8 (aA)
48 horas	G1	29,4 ± 44,57 (aA)	400,9 ± 44,57 (aB)	200,85 ± 44,57 (aAB)	29,4 ± 17,8 (aA)	29,4 ± 17,8 (aA)	29,4 ± 17,8 (abA)
	G2	130,95 ± 63,03 (aA)	2068,25 ± 63,03 (bB)	187,30 ± 63,03 (aA)	43,7 ± 17,8 (aA)	43,7 ± 17,8 (aA)	87,3 ± 17,8 (abA)
	G3	46,50 ± 49,83 (aA)	421,50 ± 49,83 (aB)	46,50 ± 49,83 (aA)	46,5 ± 19,9 (aA)	202,75 ± 19,9 (bB)	109,0 ± 19,9 (aAB)
	G4	0,0 ± 44,57 (aA)	617,1 ± 44,57 (aB)	17,1 ± 44,57 (aA)	0,0 ± 17,8 (aA)	0,0 ± 17,8 (aA)	0,0 ± 17,8 (bA)
72 horas	G1	29,4 ± 44,57 (aA)	472,3 ± 44,57 (aB)	500,9 ± 44,57 (aB)	29,4 ± 17,8(aA)	29,4 ± 17,8 (aA)	29,4 ± 17,8 (aA)
	G2	43,65 ± 63,03 (aA)	1118,25 ± 63,03 (bB)	0,0 ± 63,03 (bA)	0,0 ± 17,8 (aA)	43,7 ± 17,8 (aA)	43,7 ± 17,8 (abA)
	G3	46,50 ± 49,83 (aA)	327,75 ± 49,83 (aB)	46,5 ± 49,83 (bA)	77,75 ± 19,9(aA)	140,25 ± 19,9 (bA)	140,25 ± 19,9 (bA)
	G4	34,3 ± 44,57 (aA)	320,0 ± 44,57 (aB)	34,3 ± 44,57 (bA)	88,6 ± 17,8 (aA)	34,4 ± 17,8 (aA)	0,0 ± 17,8 (aA)

Tabela 8. Produção de IL-10 (pg/ml) de células de baço e linfonodos de camundongos BALB/c dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (controle negativo). As concentrações de citocinas foram determinadas pelo ELISA de captura (BD Biosciences). Os dados estão expressos em médias ± erro padrão de medidas (EP). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Letras maiúsculas representam comparações entre grupos para cada tempo (vertical), e letras minúsculas representam comparações entre estímulos para cada tempo (horizontal).

V. Imunofenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em células de baço e linfonodos de camundongos por Citometria de Fluxo

V.2.1. Determinação das subpopulações de linfócitos T nas células esplênicas e nos linfonodos poplíteos

A porcentagem de linfócitos no baço e linfonodo de cada animal, dos grupos G1, G2, G3 e G4, foi analisada de acordo com a presença de imunomarcadores CD4⁺ e CD8⁺ e de acordo com o percentual da Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) de cada marcador (CD4⁺ e CD8⁺) na superfície das células, sempre em relação à população de linfócitos T (CD3⁺) existentes. Na Figura 8, na comparação entre grupos, é possível verificar que, praticamente, não houve diferença na proliferação de células CD4⁺ tanto no baço quanto nos linfonodos. No entanto, verificou-se, quando comparado o percentual MIF dessas células imunomarcadas, que são estatisticamente diferentes. No baço, o grupo G1, foi quem apresentou maior intensidade de CD4⁺, estatisticamente diferente. No entanto, nos linfonodos, o grupo G2 apresentou maior intensidade de marcação.

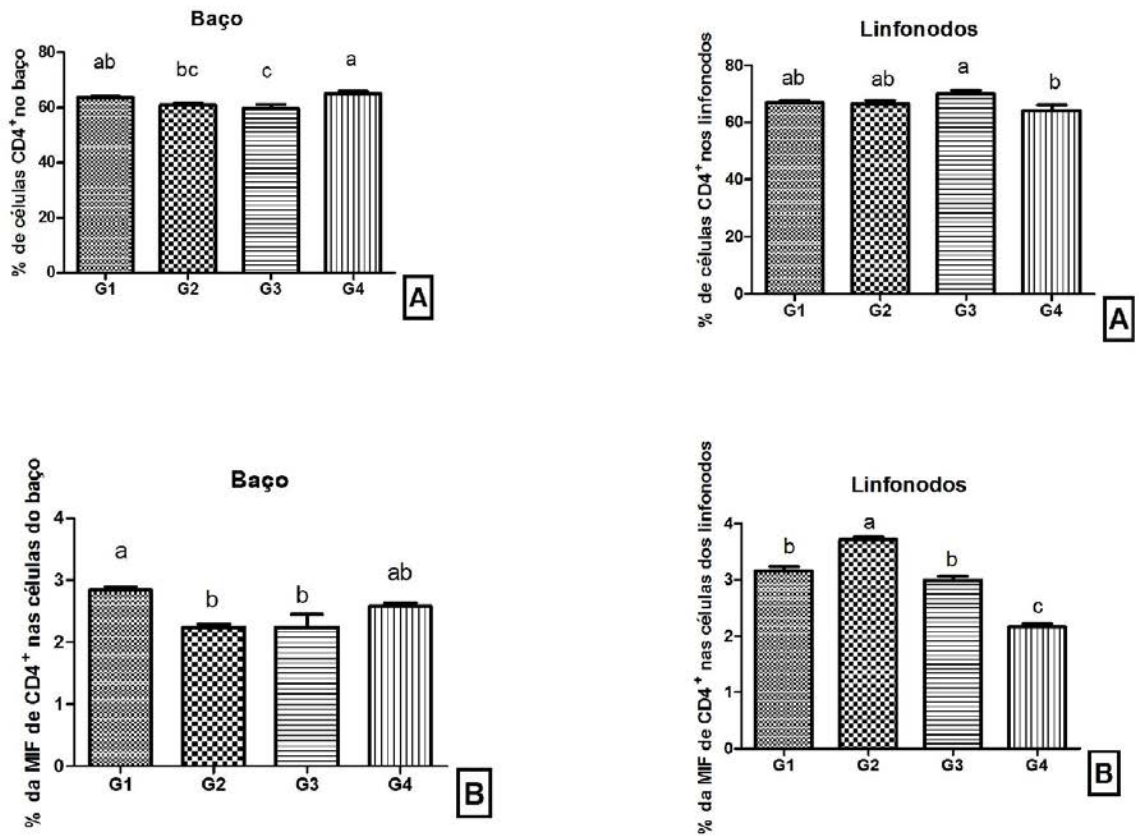


Figura 8. Percentual de células CD4⁺ em relação à população de linfócitos T (CD3⁺) existentes no baço e linfonodo de cada grupo de camundongos BALB/c (A) e percentual da Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) dos receptores CD4⁺ na superfície das células (B). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*), e G4 (animais do grupo controle negativo).

Na Figura 9, na comparação entre grupos, nas células esplênicas, o grupo G2 foi o que apresentou menor porcentagem de células CD8⁺ imunomarcadas. Porém, o inverso foi verificado nas células do linfonodo, pois o grupo G2 apresentou maior imunomarcação dessas células. Em relação ao percentual MIF, não foi estatisticamente diferente nas células do baço, entre os grupos G1, G2 e G3, sendo o G4 estatisticamente diferente com maior produção de células imunomarcadas. A porcentagem de MIF nos linfonodos foi diferente estatisticamente, sendo o G2 (assim como na porcentagem de MIF de CD4⁺) o grupo que apresentou maior intensidade de fluorescência, seguido pelo grupo G3.

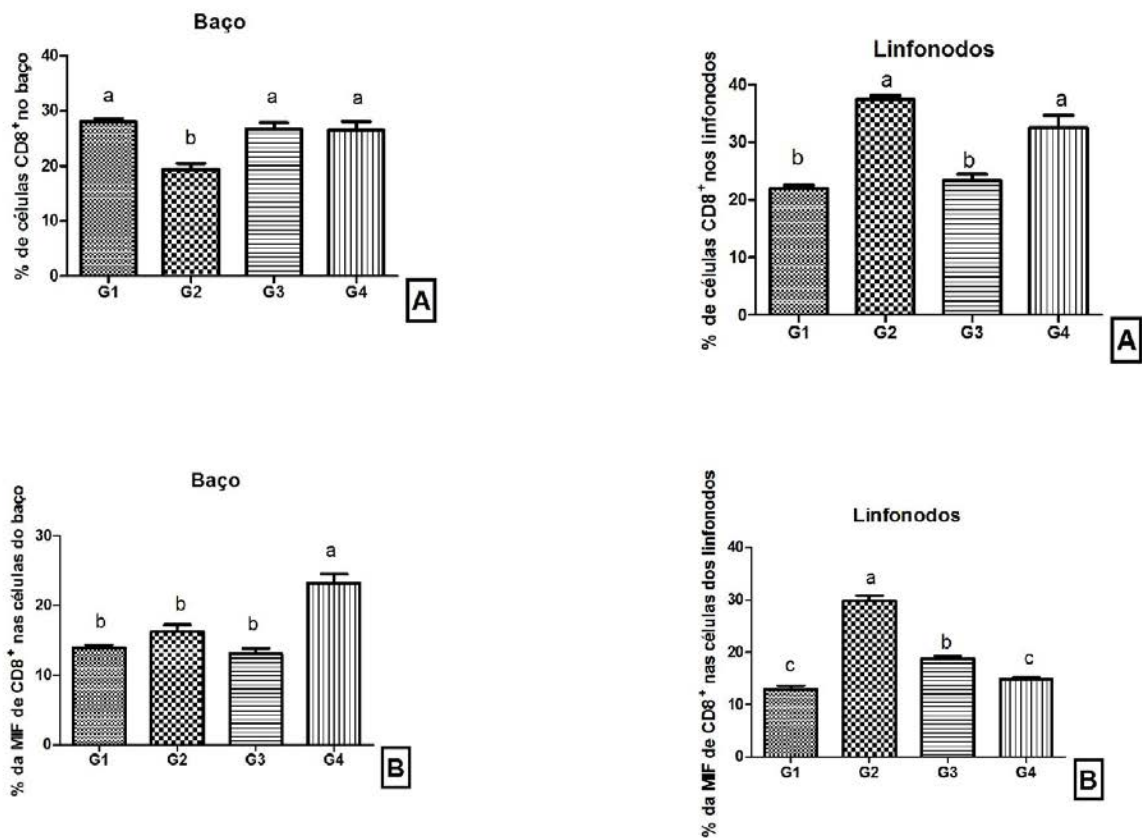


Figura 9. Percentual de células CD8⁺ em relação à população de linfócitos T (CD3⁺) existentes no baço e linfonodo de cada grupo de camundongos BALB/c (A) e percentual da Média da Intensidade de Fluorescência (MIF) dos receptores CD8⁺ na superfície das células (B). Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).

VI. Análise Histopatológica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos

VI.2.1. Análise Microscópica do Grupo 1

Na análise do baço e do linfonodo poplíteo dos animais do grupo G1, as amostras apresentaram reação inflamatória com graus variados de intensidade. No baço, conforme Figuras 10 A e 11 B, o perfil celular predominante foi semelhante ao do grupo controle G4, de moderada atividade linfoide, moderada presença de macrófagos e plasmócitos inalterados. Observou-se a presença de granulomas multifocais na região da polpa vermelha, assim como a presença de células gigantes, células Mott (comum em animais imunossuprimidos) e células epitelioides. A metaplasia mioeloides estava presente em intensidade de discreta a acentuada, com presença moderada de megacariócitos. Verificou-se hemorragia de grau discreto a acentuado tanto na região de polpa vermelha quanto na transição desta com a polpa branca. Também foi verificada presença discreta de células com características apoptóticas localizadas na região de polpa branca e em polpa vermelha. A reatividade linfoide variou de moderada a acentuada, enquanto a plasmocitose e a presença de macrófagos, na polpa vermelha, variaram de ausente a moderada. Na polpa vermelha, observou-se desde uma atrofia ocasionada pela intensa reatividade linfoide até uma hiperplasia dessa região.

O perfil celular predominante nos linfonodos foi de acentuada presença de macrófagos, atrofia linfoide e plasmócitos inalterados. Assim como no baço, também havia apoptose discreta nas regiões cortical e medular, assim como na transição entre elas. A reatividade linfoide variou de não reativo a uma discreta reatividade. Verificou-se a presença de granulomas multifocais na região medular e também na região subcapsular.

Foi observada, no baço e no linfonodo, a presença de plasmócitos contendo Corpúsculos de Russell. Este foi o único grupo em que não foi verificada a presença de neutrófilos tanto no baço quanto no linfonodo.

VI.2.2. Análise Microscópica do Grupo 2

No baço, o perfil celular predominante foi de acentuada reatividade linfóide (figura 10 B), moderada presença de macrófagos e plasmócitos inalterados. Ao contrário dos grupos G1 e G3, não se observou a presença de granulomas. Mas, assim como no grupo G3, verificou-se a presença de neutrófilos e eosinófilo e metaplasia mieloide acentuada em relação aos outros grupos. Verificou-se hemorragia de grau discreto tanto na região de polpa vermelha quanto na transição desta com a polpa branca. Foram encontradas células com características apoptóticas nas regiões de polpa vermelha e de polpa branca. A reatividade linfóide variou de discreta a acentuada. A plasmocitose variou de discreta a moderada, e a presença de macrófagos variou de ausente a discreta.

Nos linfonodos deste grupo, as células com características apoptóticas nas regiões cortical e medular, variaram de discretas a acentuado e, no baço, verificou-se a presença de neutrófilos. Neste órgão também foi verificada acentuada reatividade linfóide, moderada presença de macrófagos e plasmocitose inalterada. Os grupos G2 e G3 apresentaram acentuada presença de linfócitos, quando comparados ao grupo controle G4 e também em relação ao grupo G1.

VI.2.3. Análise Microscópica do Grupo 3

Na análise de tecidos do baço e do linfonodo poplíteo dos animais do grupo G3, observou-se uma inflamação intensa tanto no baço quanto no linfonodo. No baço, o perfil celular predominante foi de acentuada reatividade linfóide (figura 11 A), moderada presença de macrófagos e moderada presença de plasmócitos. Observou-se a presença de granulomas multifocais na região da polpa vermelha, assim como a presença de células gigantes, eosinófilos e neutrófilos em graus de discreto a moderado. Metaplasia mieloide foi discreta a acentuada. Observou-se também a presença de macrófagos reativos. Verificou-se hemorragia de grau discreto a acentuado tanto na região de polpa vermelha quanto na transição desta com a polpa branca. Foram encontradas apoptose nas regiões de polpa vermelha e de polpa branca. Exclusivamente neste grupo G3, verificou-se acentuada reatividade

linfoide em todos os animais. A plasmocitose na polpa vermelha variou de discreta a moderada e, na região medular, de ausente a moderada; e a presença de macrófagos variou de discreta a moderada. Exclusivamente neste grupo G3, encontraram-se focos de necrose que variaram de discretos a intensos.

Nos linfonodos deste grupo, a apoptose nas regiões cortical e medular variou de discreta a acentuada. Assim como no baço, também foram verificadas focos de necrose que variaram em graus de discretos a intensos. A reatividade linfoide foi acentuada e a plasmocitose moderada. A presença de macrófagos foi moderada.

VI.2.4. Análise Microscópica do Grupo 4

No baço, o perfil celular predominante foi de moderada presença de linfócitos e de macrófagos e discreta plasmocitose. Observou-se também a presença de células gigantes e de neutrófilos e metaplasia mieloide de discreta a acentuada. Verificamos hemorragia de grau discreto, tanto na região de polpa vermelha quanto na transição desta com a polpa branca. Foi encontrada apoptose nas regiões de polpa vermelha e de polpa branca. A reatividade linfoide e a plasmocitose variaram de discreta a acentuada, e a presença de macrófagos variou de ausente a discreta.

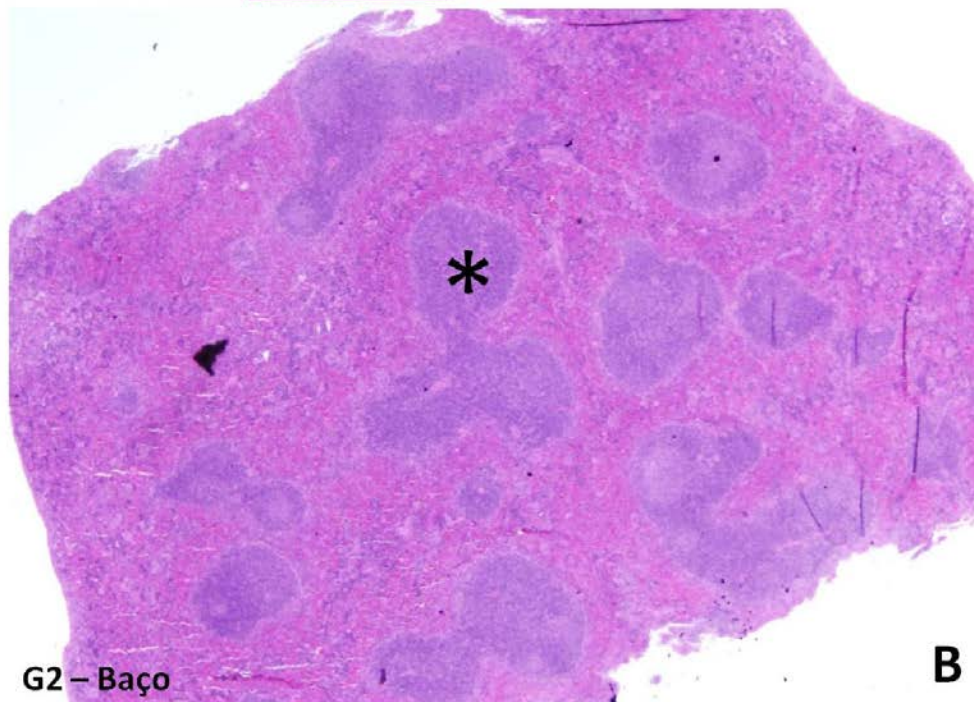
Nos linfonodos deste grupo, verificaram-se apenas células em apoptose nas regiões cortical e medular (de discretas a acentuadas) e assim como no baço, verificamos a presença de neutrófilos. A reatividade linfoide foi moderada e a plasmocitose discreta. A presença de macrófagos foi acentuada (Figura 11 B).

As Figuras 12, 13 e 14 mostram o número de animais de acordo com o infiltrado inflamatório para cada um dos grupos (G1, G2, G3 e G4) analisadas pela frequência de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, tanto no baço quanto nos linfonodos.



G1 – Baço

A



G2 – Baço

B

Figura 10. Fotomicrografias de baço de camundongo BALB/c dos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L) (A) e (B), respectivamente. Observar a acentuada reatividade linfóide (*) (Objetiva 20X). Hematoxilina e Eosina.

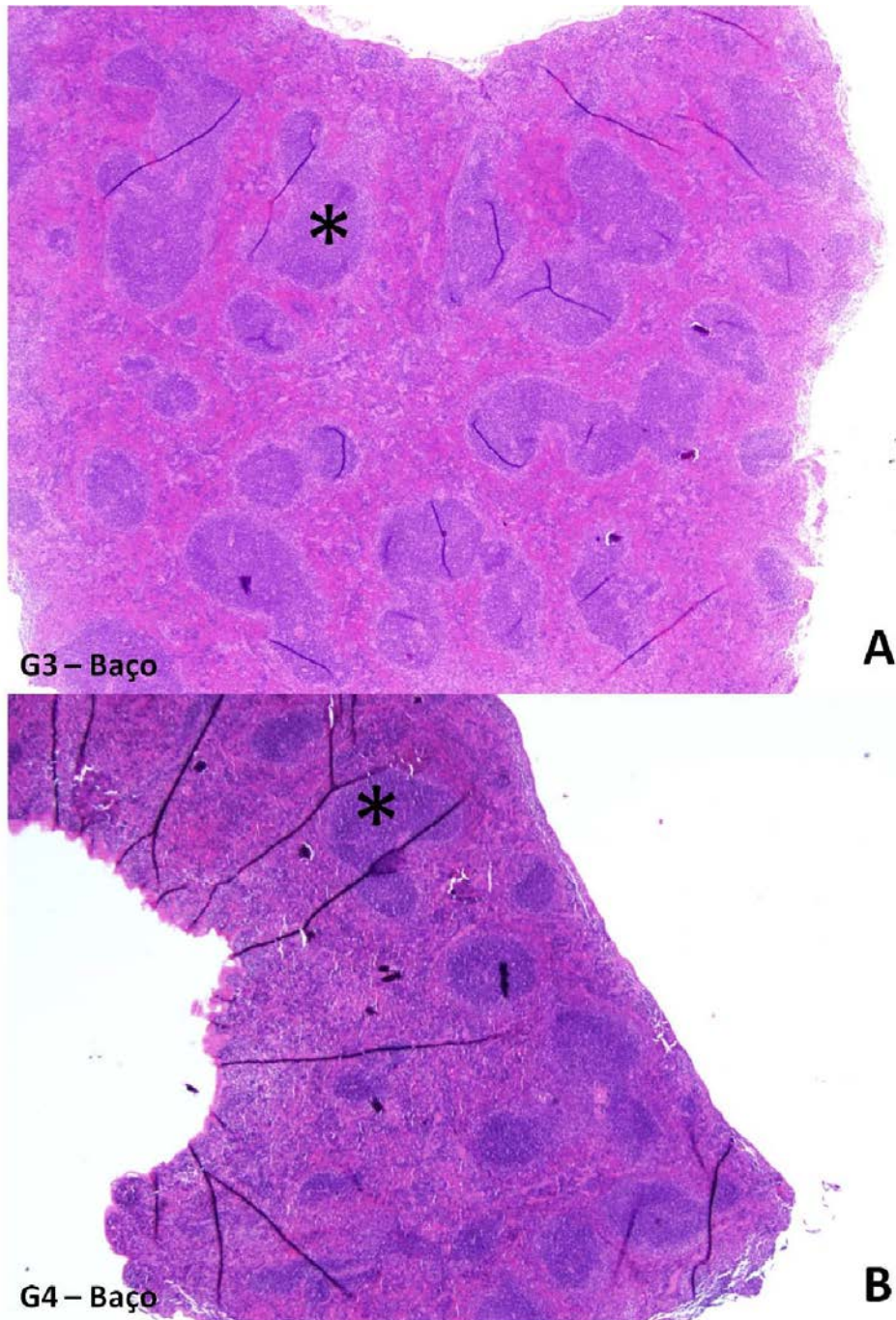


Figura 11. Fotomicrografias de baço de camundongo BALB/c dos grupos G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle) (A) e (B), respectivamente. Observar a acentuada reatividade linfóide (*) (Objetiva 20X). Hematoxilina e Eosina.

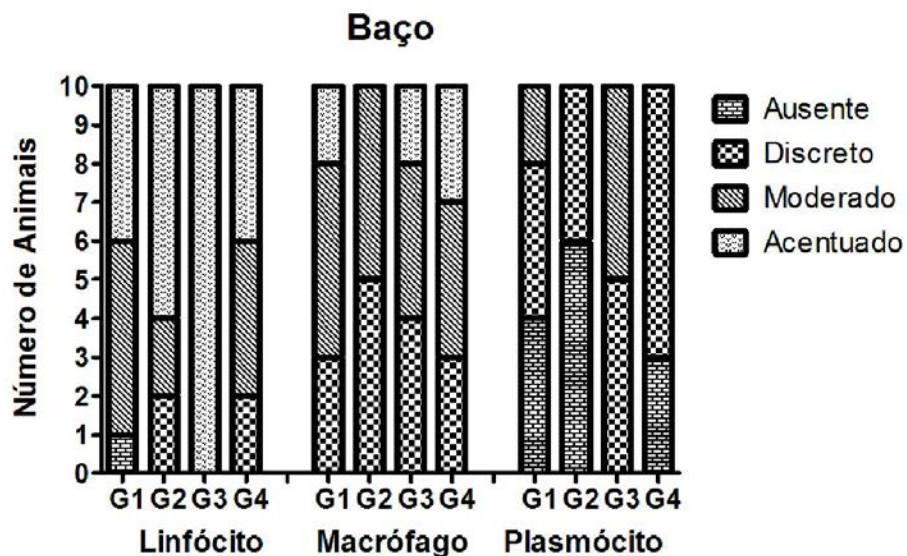


Figura 12. Frequência de infiltrado inflamatório no baço dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para linfócitos, macrófagos e plasmócitos.

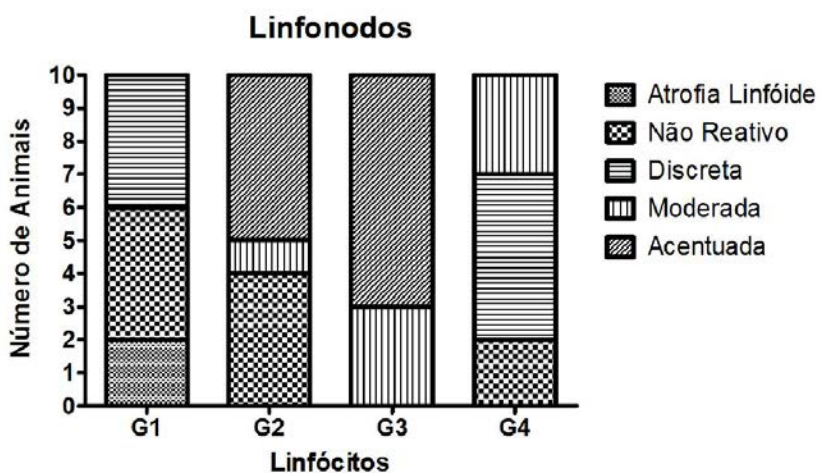


Figura 13. Frequência de infiltrado inflamatório nos linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para linfócitos.

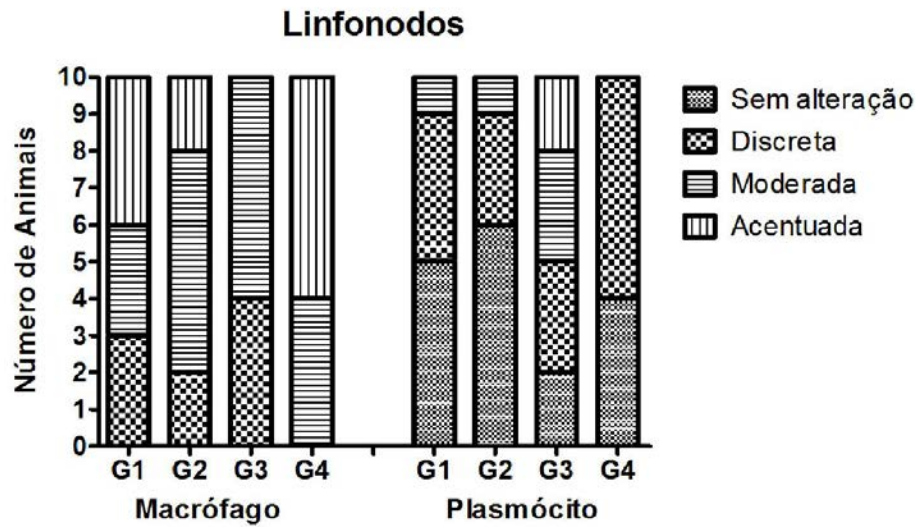


Figura 14. Frequência de infiltrado inflamatório no baço dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo). Escores de intensidade de infiltrado inflamatório para macrófagos e plasmócitos.

VII. Análise imuno-histoquímica em tecidos de baço e linfonodo dos camundongos

VII.2.1. Análise Imuno-histoquímica

A porcentagem de imunomarcção de células expressando iNOS no tecido do baço foi maior nos grupos G1 e G3 e estatisticamente diferente entre ambos. No entanto, o grupo G3 teve porcentagem maior, estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle G4. Nos linfonodos, os grupos G2 e G3 apresentaram maior porcentagem de células imunomarcadas para iNOS. Nota-se que, neste órgão, o grupo G1 ficou com porcentagem inferior em relação ao grupo controle G4 (Figura 15).

A porcentagem de imunomarcção de células esplênicas expressando MHC I, apesar de apresentar-se maior, não foi estatisticamente significativa em relação ao grupos G3 e G4. Já nos tecidos de linfonodo, G3 foi significativamente diferente de todos os outros grupos, conforme evidenciado na Figura 15.

Em relação à imunomarcção de células expressando MHC II, a porcentagem nos tecidos do baço foi maior nos grupos G3 e G1, sem ser estatisticamente diferente entre eles. No entanto G3 foi estatisticamente maior, em relação ao grupo G4. Nos linfonodos, novamente o grupo G3 se destacou, sendo significativamente diferente do grupo G1 (Figura 15).

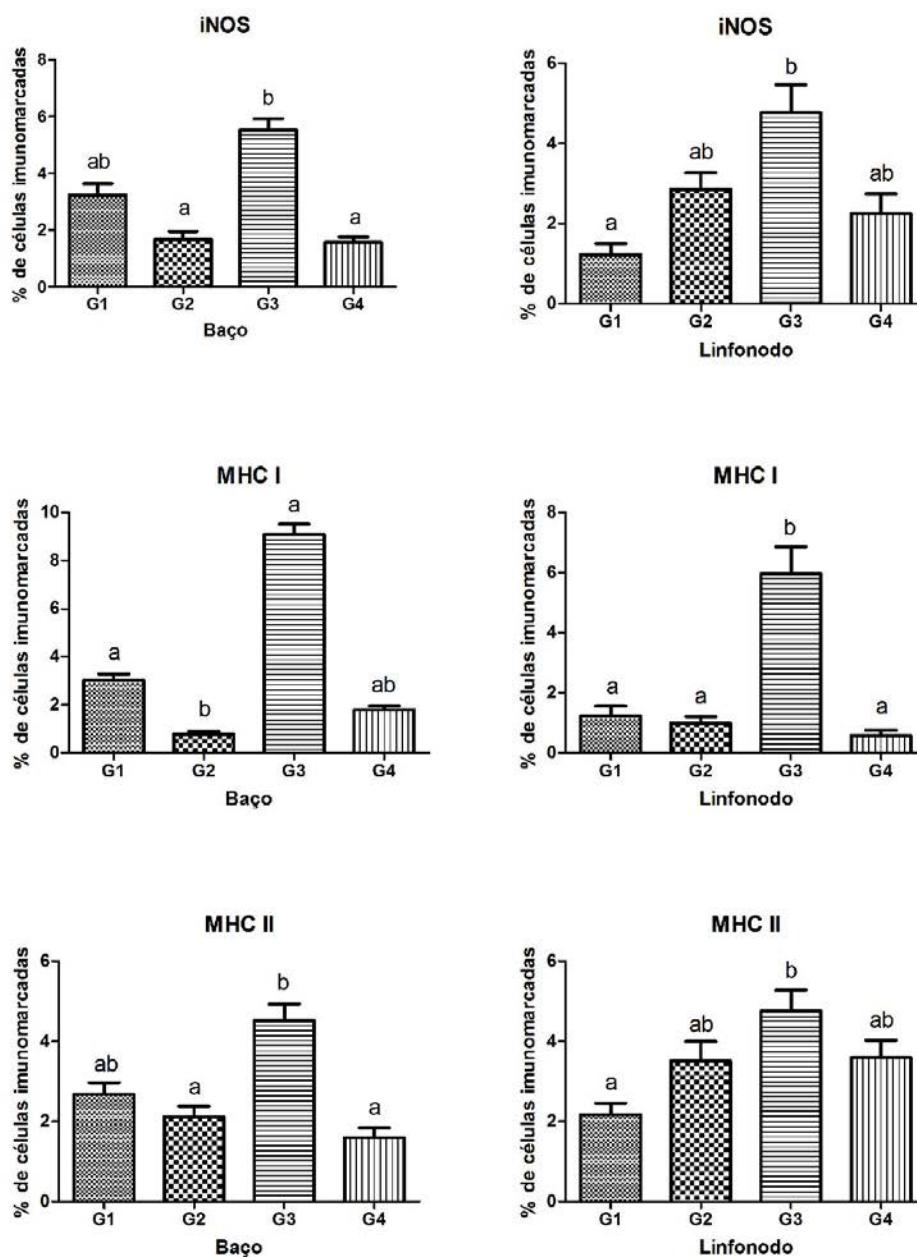


Figura 15. Porcentagem de células imunomarcadas para células expressando iNOS, MHC I e MHC II, em tecidos de baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).

A porcentagem de imunomarcção de células expressando CD8⁺ no baço foi maior nos grupos G3 e G1, porém, em G3, a porcentagem foi maior e estatisticamente diferente em relação ao grupo G4. No linfonodo, o grupo G3 apresentou porcentagem significativamente maior de células CD8⁺ imunomarcadas do que nos grupos G1 e G4.

No baço, a porcentagem de células imunomarcadas expressando CD4⁺, foi maior nos grupos G1 e G3, e ambos foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo G4. Nas células do linfonodo, não houve diferença significativa entre todos os grupos.

A porcentagem de imunomarcção de macrófagos nos tecidos do baço foi similar entre os grupos G1, G3 e G4. Nas células do linfonodo, não houve diferença significativa entre todos os grupos (Figura 16)

No baço, a porcentagem de células imunomarcadas com o anticorpo anti-CD79 dos grupos G1 e G3 foi maior do que no grupo G4, estatisticamente diferente, e o mesmo aconteceu para as células do linfonodo.

De modo geral, o grupo G3 teve porcentagem de imunomarcção, das células do linfonodo, maior do que todos os outros grupos, para os anticorpos anti-CD8, anti-iNOS e anti-MHC II. E, no baço, o grupo G3 se destacou dos demais grupos em relação ao anticorpo anti-MHC I. Entretanto, não se caracterizaram diferenças significativas, tanto no baço quanto no linfonodo, especificamente entre os grupos G1 e G3, para os anticorpos anti-macrófago, anti-CD4⁺ e anti-CD79. Apesar disso, para este último anticorpo, anti-CD79, nas células do linfonodo, G1 e G3 apresentaram maior porcentagem, estatisticamente diferente do grupo G4. O mesmo ocorreu para o anticorpo anti-CD4⁺ nas células do baço.

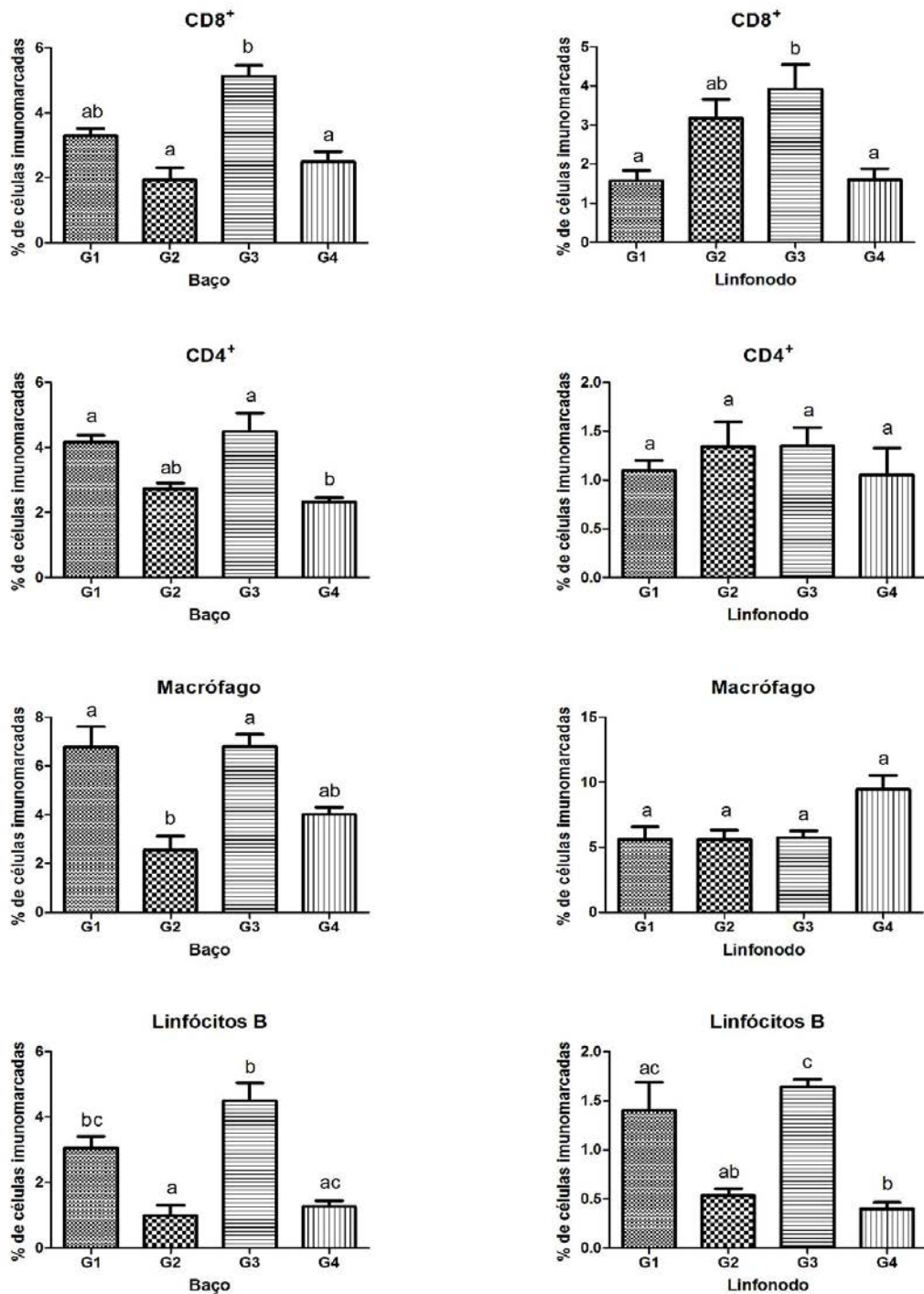


Figura 16. Porcentagem de células imunomarcadas para CD8⁺, CD4⁺, macrófagos e linfócitos B em tecidos de baço e linfonodos dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle negativo).

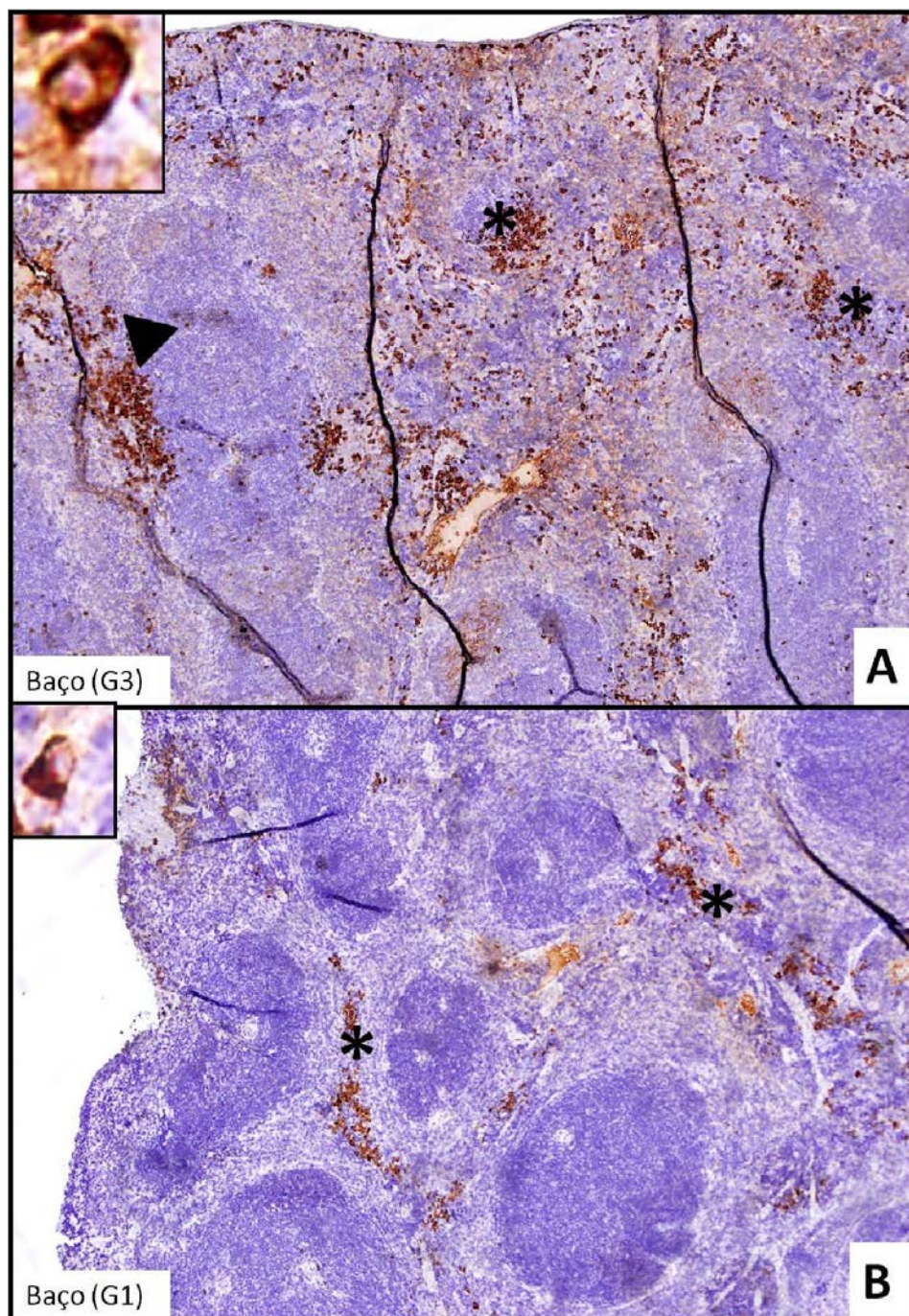


Figura 17. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando MHC I em baço de animal do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e no baço de animal do grupo G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de células expressando MHC I em região da polpa vermelha e na transição entre a polpa vermelha e a polpa branca do baço (seta) e no detalhe notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 20x). (B) Observar a imunomarcção de MHC I na região de polpa vermelha do baço (*) e, no detalhe, notar a imunomarcção em membrana celular. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 20x). Notar a diferença de marcação entre os grupos G3 e G1 para o mesmo órgão.

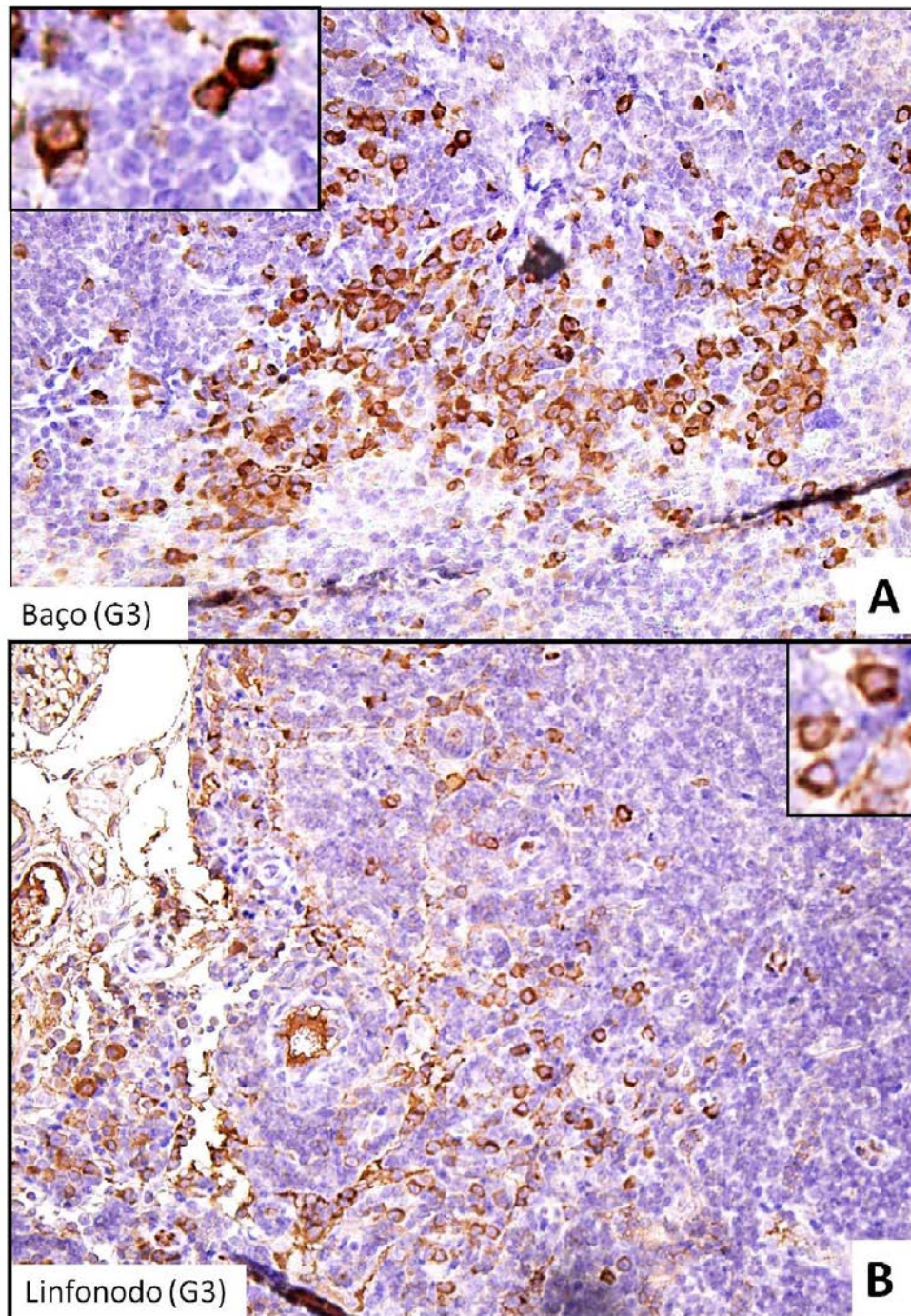


Figura 18. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células T expressando CD8⁺ no baço e linfonodos poplíteo de animais do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha. (B) Observar a imunomarcção de linfócitos T na região medular do linfonodo. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x). Nos detalhes, notar a imunomarcção em membrana celular.

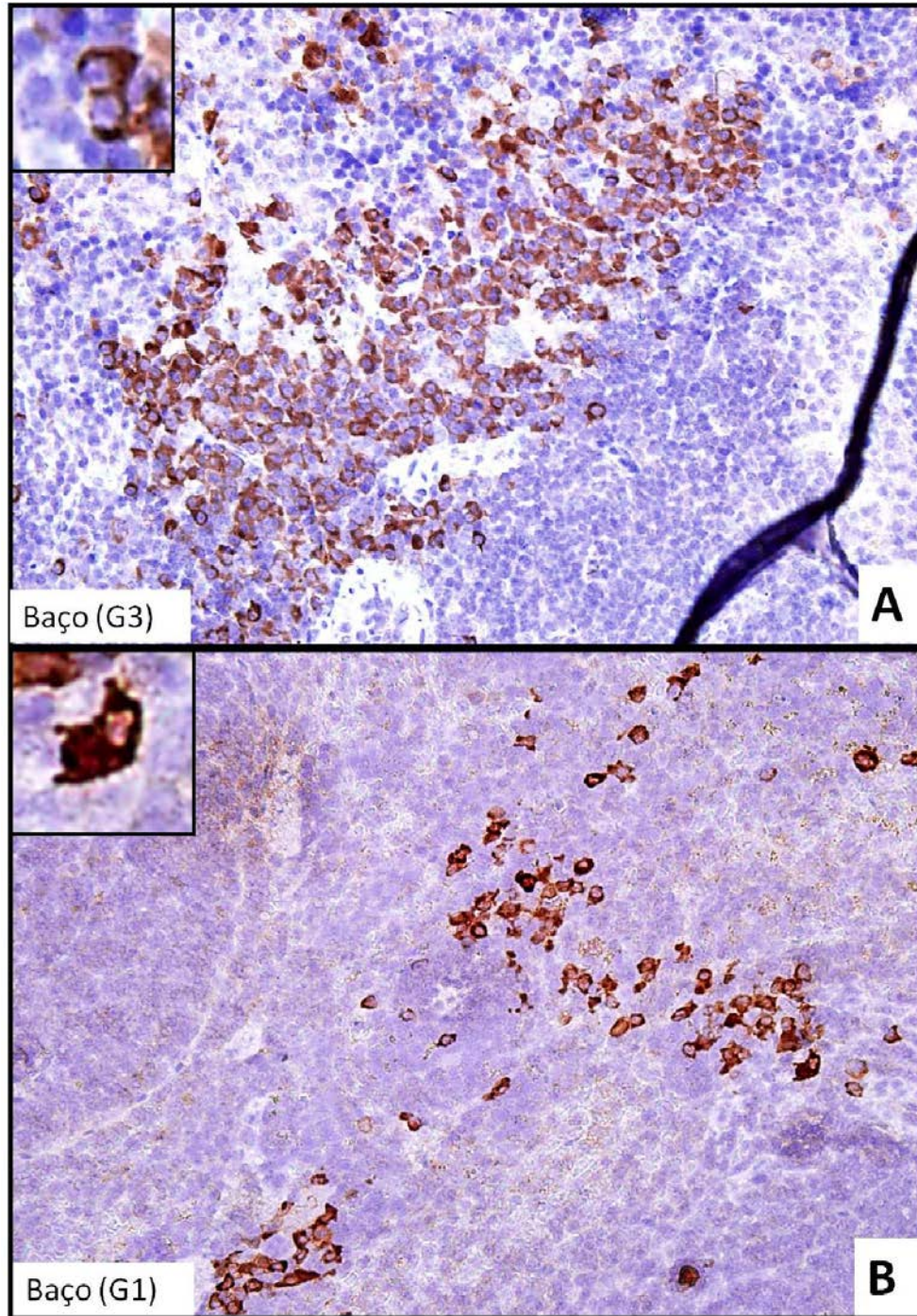


Figura 19. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando iNOS no baço de animal do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) e no baço de animal do grupo G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha. (B) Observar a imunomarcção de células também na região da polpa vermelha do baço. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. 40x). Nos detalhes, notar a imunomarcção em membrana celular.

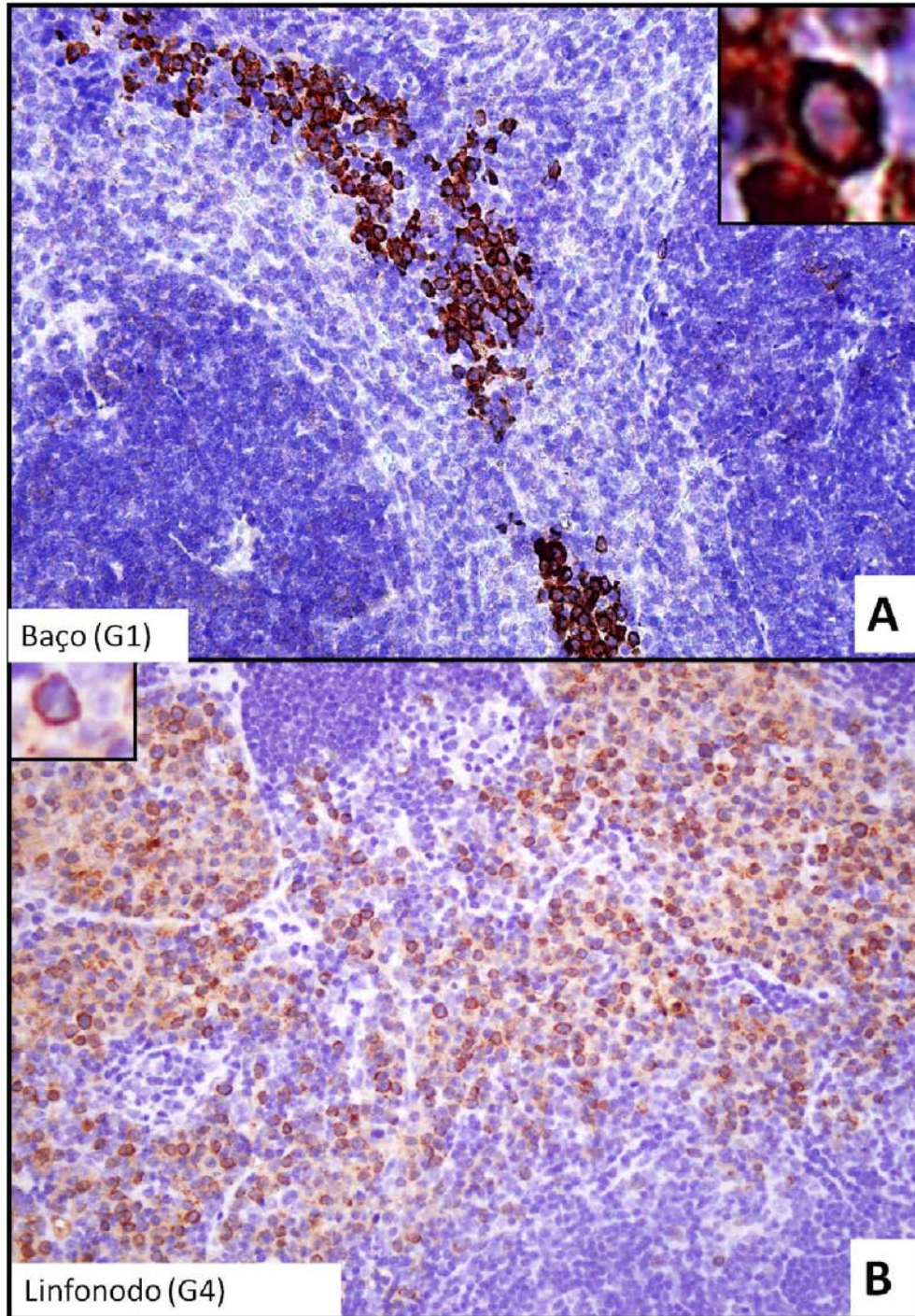


Figura 20. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para macrófagos com o anticorpo anti-MAC387 em baço e linfonodo dos animais dos grupos G1(inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G4 (animais do grupo controle). (A) Observar a imunomarcção de macrófagos na polpa vermelha do baço e no detalhe notar a imunomarcção em macrófagos. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de macrófagos na região medular do linfonodo e, no detalhe, notar a imunomarcção em macrófagos. Complexo de polímero ligado à peroxidase (Obj. 40x).

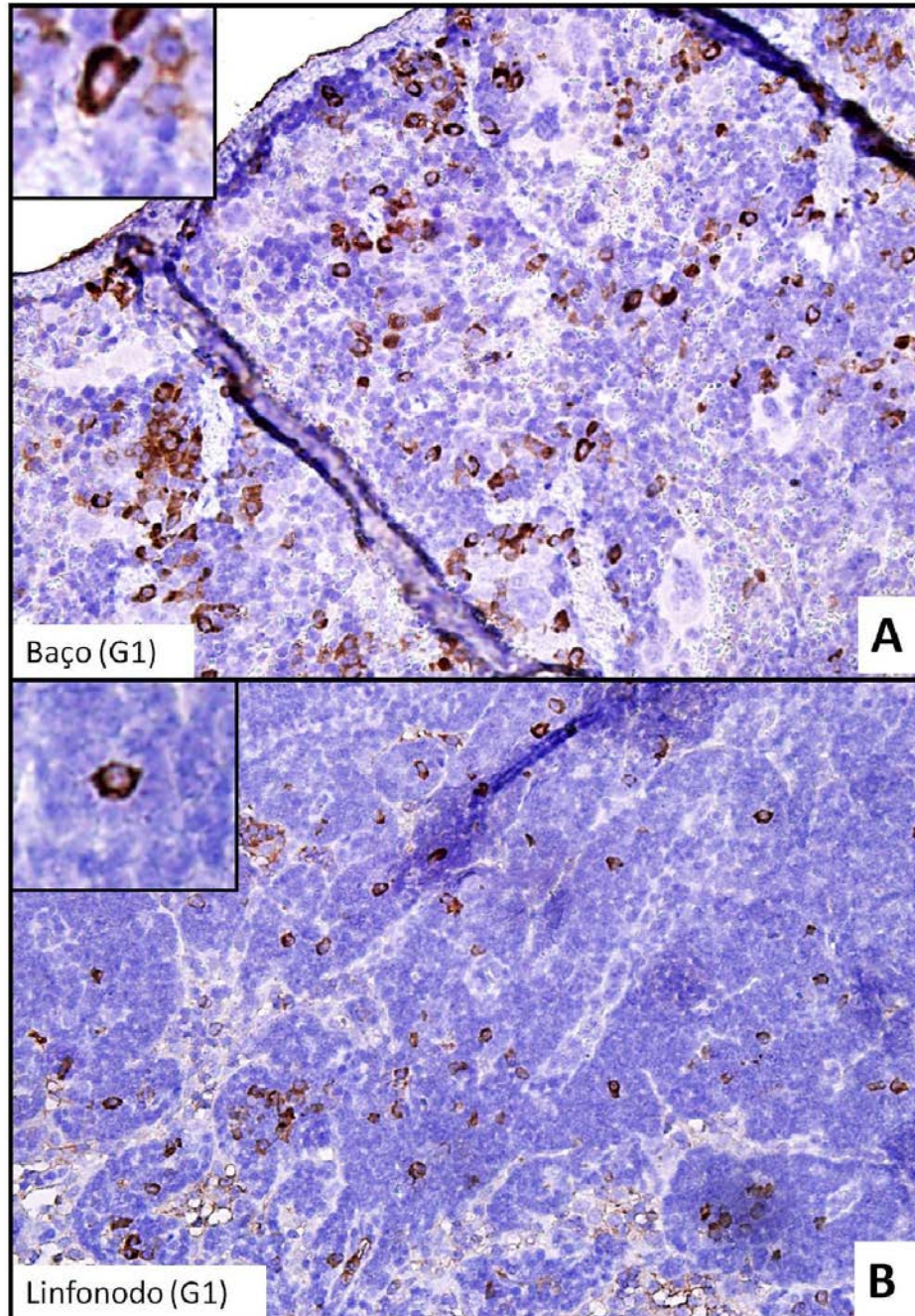


Figura 21. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para células expressando MHCII em baço e linfonodo dos animais do grupo G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de células expressando MHCII em região da polpa vermelha do baço e, no detalhe, notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de células expressando MHCII nas regiões medular e cortical do linfonodo e, no detalhe, notar a imunomarcção em membrana celular. Complexo de polímero ligado à peroxidase (Obj. 40x).

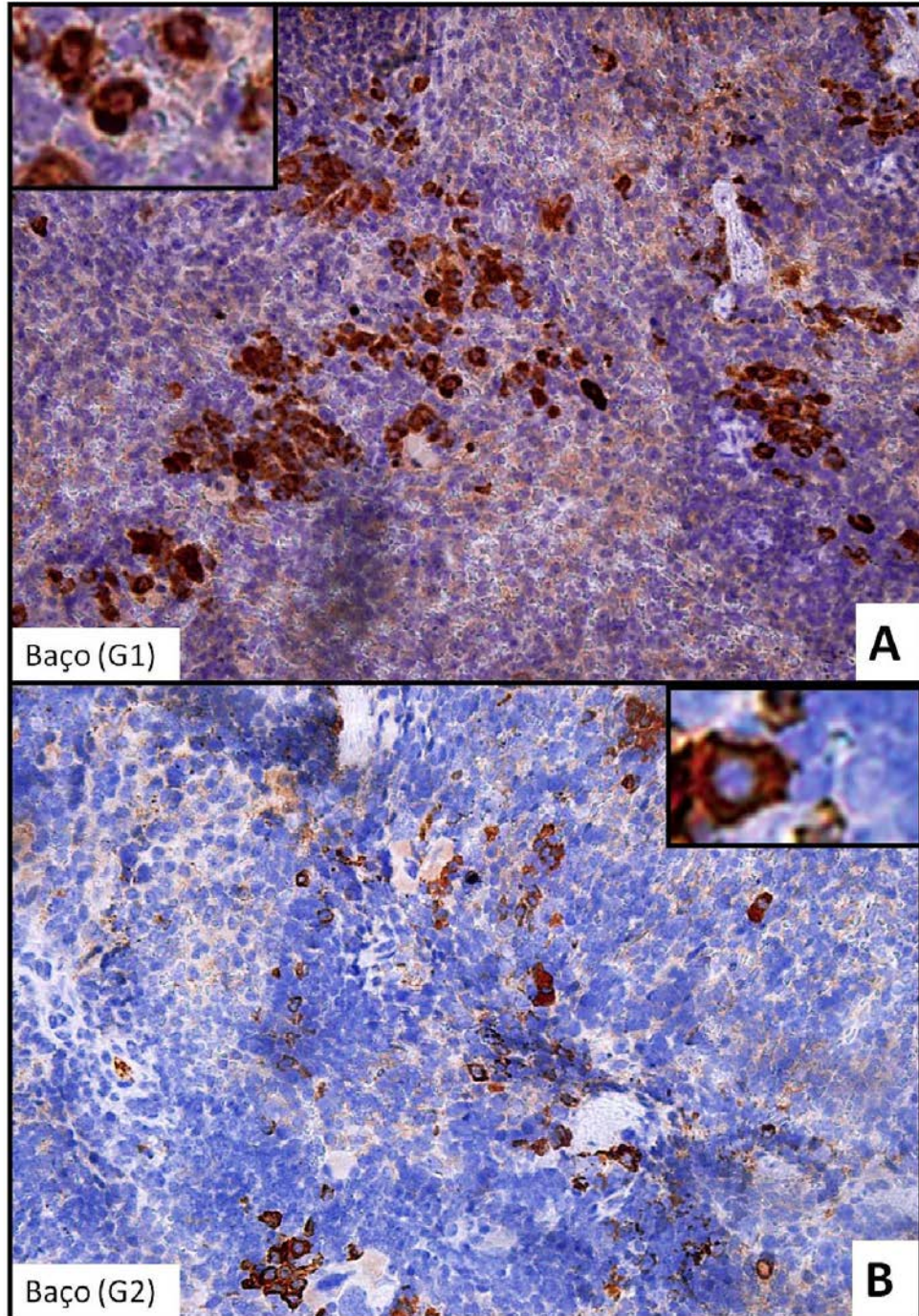


Figura 22. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para linfócitos T expressando CD4⁺ no baço de animais dos grupos G1 (inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L). (A) Observar a imunomarcção na região da polpa vermelha e polpa branca. (B) Observar a imunomarcção de linfócitos T na região da polpa vermelha e polpa branca. Complexo de polímero ligado à peroxidase (Obj. 40x).

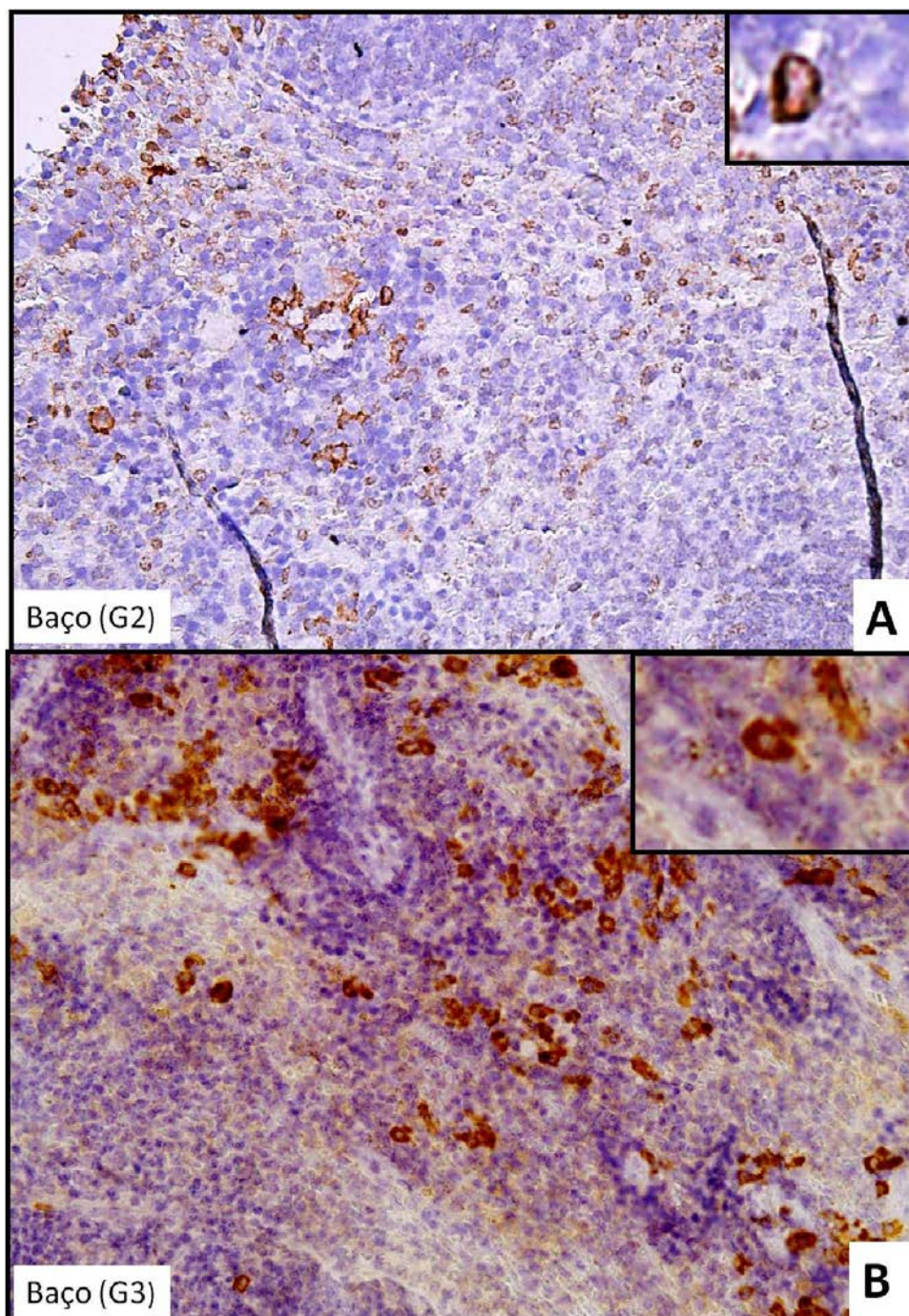


Figura 23. Fotomicrografia de imunomarcção positiva para linfócitos B com anticorpo anti-CD79 no baço dos animais dos grupos G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). (A) Observar a imunomarcção de linfócitos B em região de polpa vermelha e polpa branca do baço e, no detalhe, notar a imunomarcção na membrana celular. (Obj. 40x). (B) Observar a imunomarcção de linfócitos B na região de polpa vermelha mais intensa do que a observada no mesmo órgão do grupo G2. Complexo de polímero ligado à peroxidase (Obj. 40x).

VIII. Avaliação da expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 pela PCR em Tempo Real

VIII.2.1. Resultados da Clonagem

Objetivando confirmar que os fragmentos de DNA inseridos no vetor de clonagem pGEM T-Easy correspondiam aos fragmentos de interesse, realizou-se uma PCR convencional com os oligonucleotídeos específicos para cada citocina. Na Figura 24, abaixo, verifica-se que as amplificações dos fragmentos possuem tamanhos compatíveis com os genes das citocinas de interesse. A confirmação de cada gene, através do sequenciamento pelo BLAST, pode ser verificada na Tabela 9. Isso confirmou que as sequências clonadas eram realmente as de interesse, o que validou seu uso na construção das curvas-padrão.

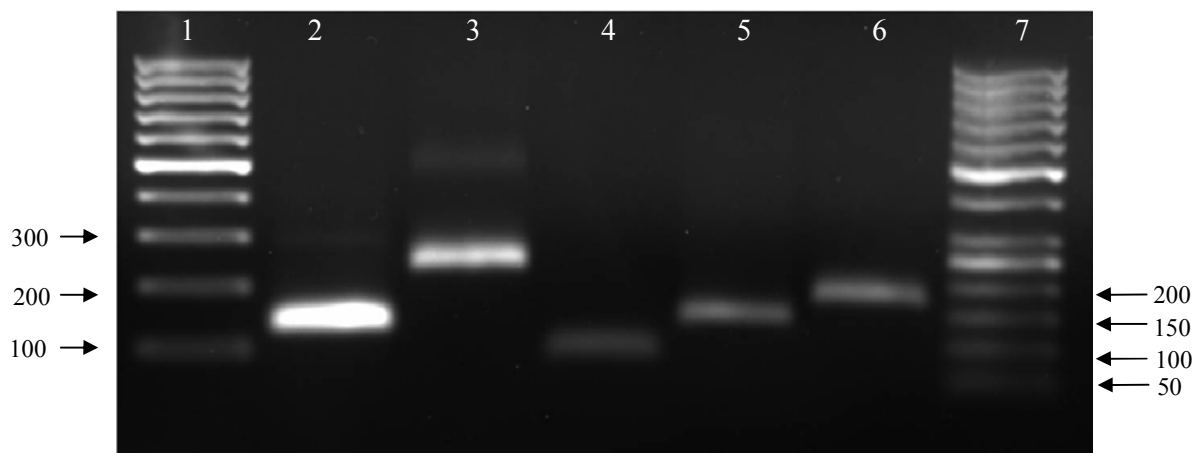


Figura 24. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos específicos para as citocinas e os genes endógenos. Linha 1: padrão 100 pb (Fermentas®). Linha 2: Clone recombinante referente ao gene endógeno β -actina (148 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 3: Clone recombinante referente ao gene endógeno GAPDH (236 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 4: Clone recombinante referente ao gene endógeno IFN- γ (92 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 5: Clone recombinante referente à IL-2 (141 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 6: Clone recombinante referente à TNF- α (175 pares de base) no vetor pGEM T-Easy. Linha 7: padrão 50 pb (Fermentas®).

Tabela 9. Identidade verificada pelo programa BLAST® para sequências de DNA de cada fragmento, obtidas a partir de reações de PCR de amostras sequenciadas a partir dos plasmídeos.

Citocina	Máxima % de identidade pelo BLAST®-
IFN-γ	mRNA (FJ617516.1) 100%
GAPDH	mRNA (DQ403054.1) 99%
β-Actina	mRNA (NM007393.3) 99%
TNF-α	mRNA (NM013693.3) 99%
IL-2	mRNA (NM008366.3) 96%

VIII.2.2. Construção das Curvas-Padrão

As concentrações dos plasmídeos, contendo os insertos de β -actina, GAPDH, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10, foram calculadas conforme item VIII.1.12. As figuras abaixo, mostram os valores da eficiência e de r^2 das respectivas curvas. As demais curvas tiveram eficiência dentro de 95 a 105% e valores de r^2 próximos de 1, permitindo a quantificação das citocinas no baço e linfonodo.

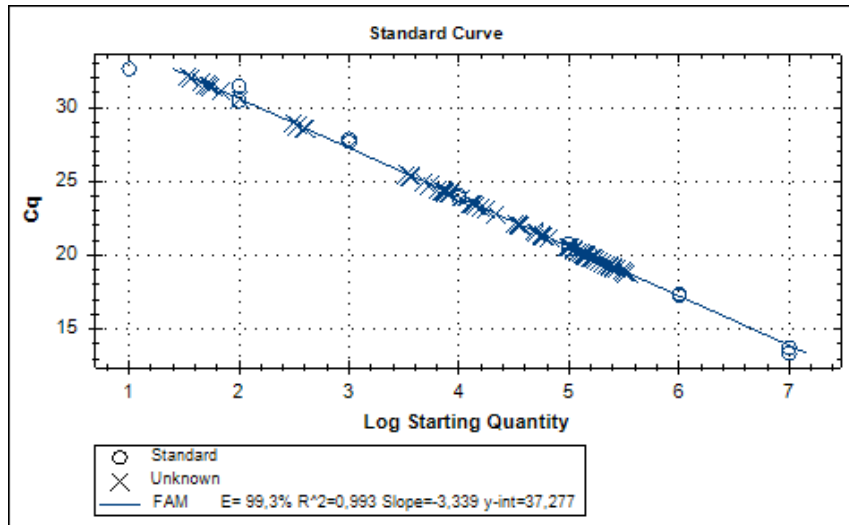


Figura 25. Curva-padrão de GAPDH construída a partir de amostras de tecido de camundongo com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de GAPDH, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Nesse teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de baço de todos os grupos em duplicata.

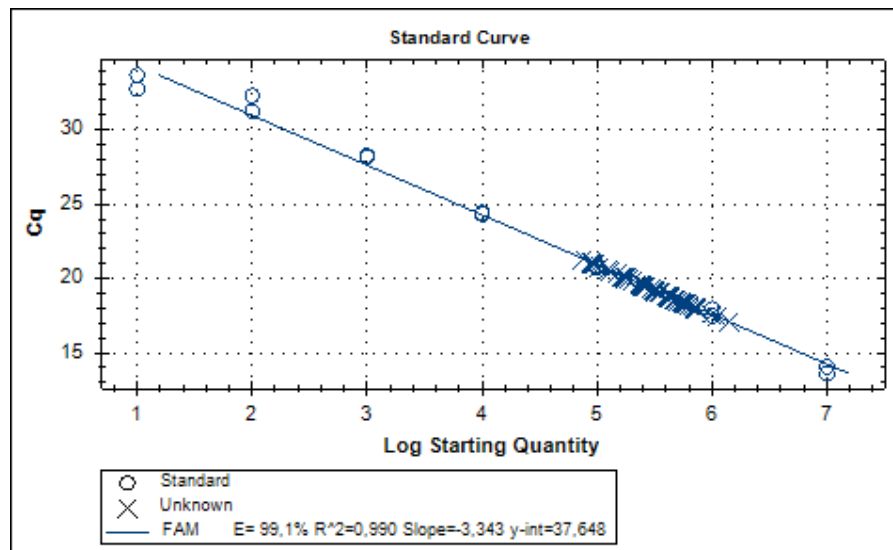


Figura 26. Curva-padrão de GAPDH construída a partir de amostras de tecido de camundongo com concentrações conhecidas do fragmento do cDNA de GAPDH, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Nesse teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de linfonodo de todos os grupos em duplicata.

VIII.2.3. Quantificação relativa da expressão das citocinas no Baço

A média dos níveis de expressão de IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 avaliados nas amostras de baço dos quatro grupos experimentais (G1, G2, G3) em relação ao grupo controle (G4), utilizado como calibrador, estão na Figura 27. Essas são as médias normalizadas. Nota-se que o grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) apresentou maior produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ do que os outros grupos, estatisticamente diferente. Não houve diferença significativa quanto à produção de IL-10. Na produção de IL-4, houve diferença entre o grupo G3 e o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*).

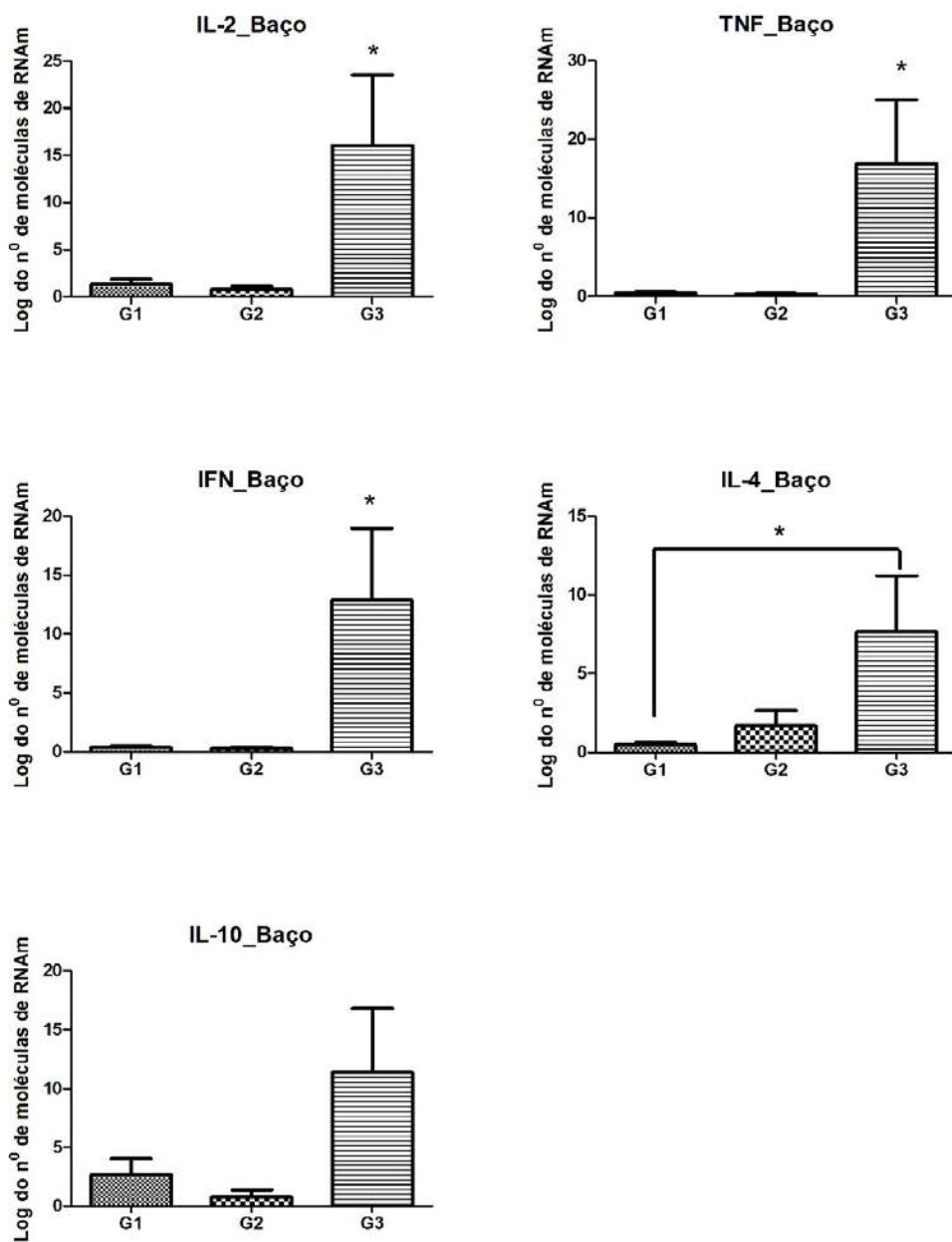


Figura 27. Avaliação da expressão das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em amostras de baço dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). O grupo G4 (animais do grupo controle negativo) serviu como calibrador e por isso não aparece no gráfico. *: Grupo difere dos demais ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Kruskal-Wallis.

VIII.2.4. Quantificação relativa da expressão das citocinas no Linfonodo

A média dos níveis de expressão de IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 avaliados nas amostras de linfonodo dos quatro grupos experimentais (G1, G2, G3) em relação ao grupo controle (G4), utilizado como calibrador, estão na Figura 28. Essas são as médias normalizadas. Não houve diferença significativa nos níveis de expressão de nenhuma das citocinas entre os grupos experimentais G1, G2 e G3, conforme se pode verificar na Figura 28.

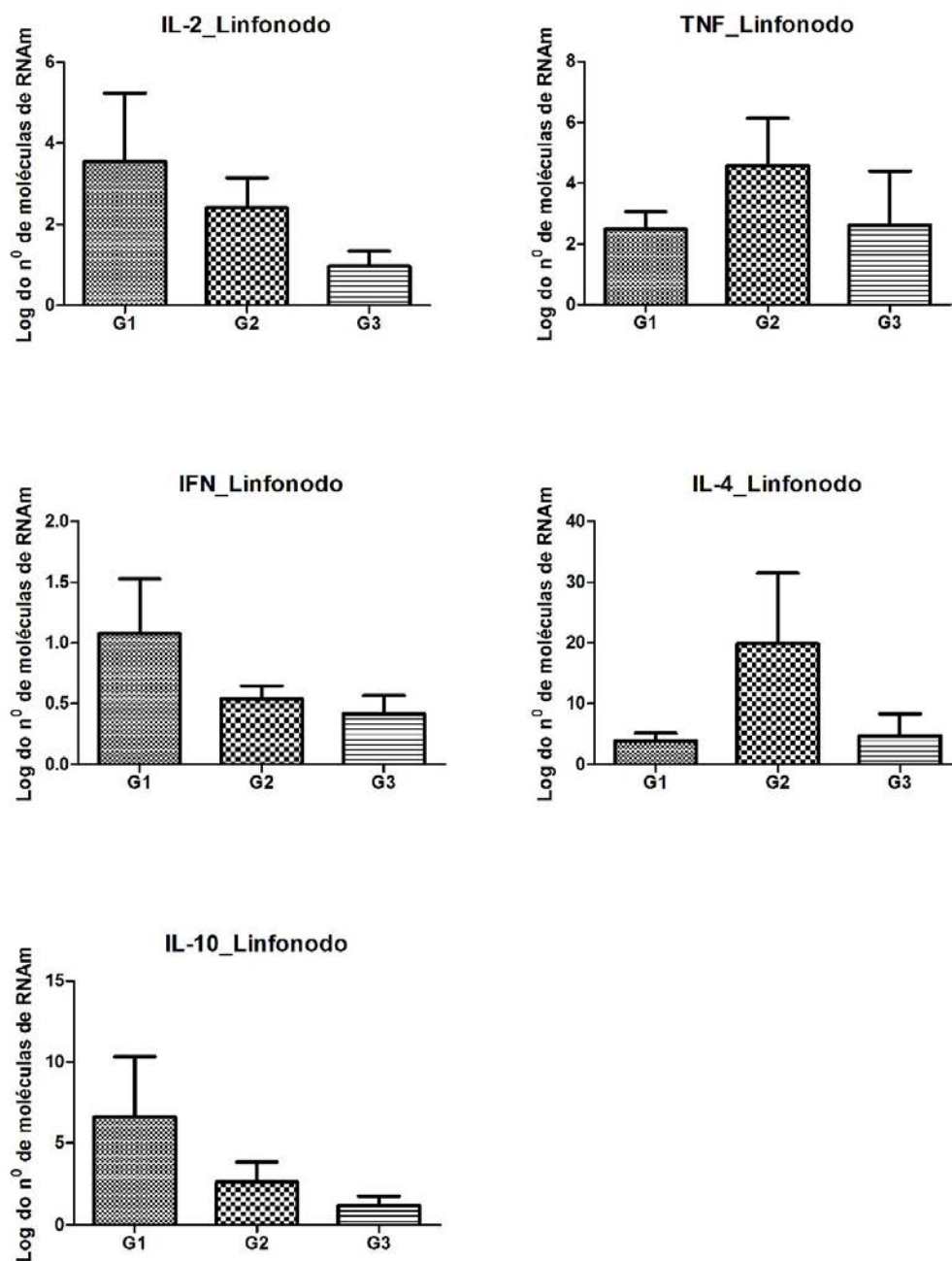


Figura 28. Avaliação da expressão das citocinas IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em amostras de linfonodo dos grupos de camundongos BALB/c, sendo o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2 e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). O grupo G4 (animais do grupo controle negativo) serviu como calibrador e por isso não aparece no gráfico. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IX. Carga Parasitária de *L. chagasi* nas amostras de tecido dos camundongos

IX.2.1. Resultados da PCR para tecidos dos grupos G1 e G3 pela PCR convencional e PCR em Tempo Real

Com exceção da amostra utilizada como controle positivo, todas as amostras de tecido de camundongos inoculadas foram negativas pela PCR convencional. Entretanto, na PCR em Tempo Real, foram encontrados resultados positivos (Figuras 29 e 30). A sensibilidade da PCR convencional foi baixa devido à pequena carga parasitária, entretanto, a PCR em Tempo Real apesar da baixa carga, conseguiu-se detectar.

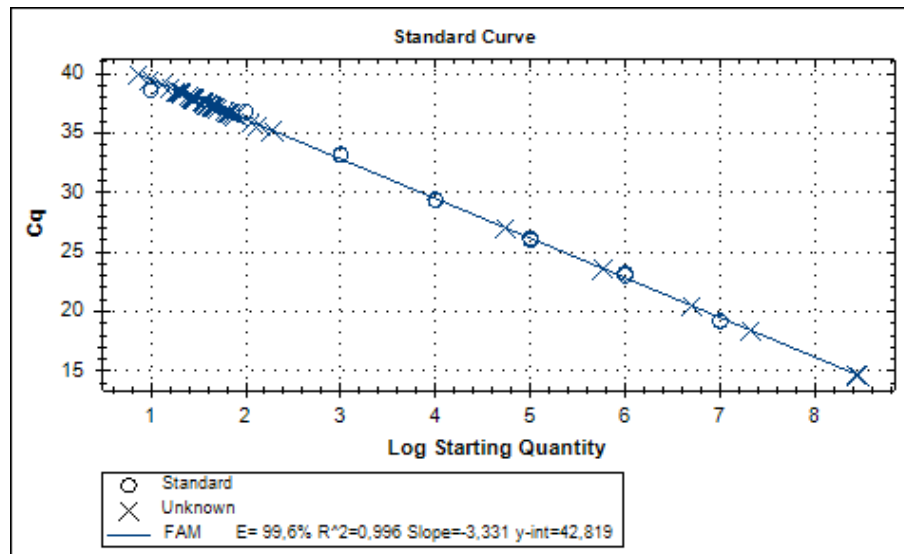


Figura 29. Curva-padrão do gene de *Leishmania chagasi* construída a partir do fragmento de DNA do parasita, ligado ao vetor, variando entre 10^7 e 10^0 moléculas. Neste teste, na mesma placa, corremos as amostras de tecido de baço dos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) em duplicata.

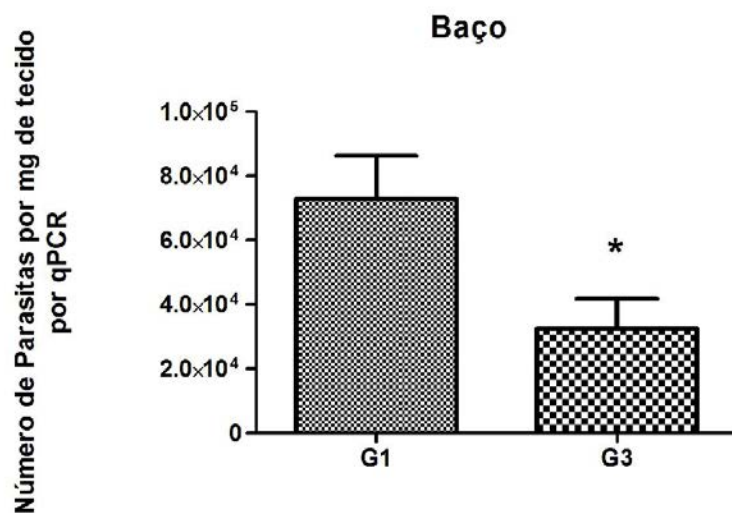


Figura 30. Infecção por *L. chagasi* em baço de camundongos BALB/c dos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). O gráfico mostra a carga parasitária por mg de fragmento de tecido por PCR em tempo real. As barras representam o desvio-padrão dos resultados. * indica que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

6. Discussão

Estudos de potenciais vacinas contra a LV são significativamente menores do que aqueles relatados contra a LC. Devido serem poucos e com resultados controversos na literatura (AHMED *et. al.*, 2003; GOTO e LINDOSO, 2004), outros como esses sobre resposta imune frente à infecção por *L. chagasi* e imunizações com proteínas recombinantes se fazem tão importante. Segundo revisão de Goto e Lindoso (2004), o mecanismo de resistência contra a leishmaniose visceral envolve ambas as células T (CD4⁺ e CD8⁺), as interleucinas 2 e 12 (IL-2 e IL-12) e IFN- γ , e a susceptibilidade envolve IL-10, mas não a IL-4 e as células B.

Entretanto, outros aspectos devem ser levados em consideração na infecção de camundongos por LV, tais como: a amostra do parasita utilizada, a genética do camundongo, a rota de inoculação e a quantidade de parasitas inoculados (CARRIÓN *et. al.*, 2006). Neste presente trabalho, utilizaram-se diferentes amostras de *L. chagasi* de origens diferentes (dados não apresentados), porém, apenas a amostra, gentilmente cedida pelo ICB da UFMG, foi capaz de desencadear a resposta humoral.

Antígenos recombinantes como A2 e K39 têm sido utilizados em testes de diagnósticos para leishmaniose, a fim de se desenvolverem testes mais simples, rápidos e específicos. A proteína recombinante A2 já foi utilizada tanto para testes de diagnóstico em ELISA como para desenvolvimento de vacinas (CARVALHO *et. al.*, 2002; FERNANDES *et. al.*, 2008). No laboratório de imunoparasitologia, foi expressa uma proteína recombinante de *L. chagasi*, amostra Jaboticabal-SP, a qual foi utilizada para caracterizar a resposta imune humoral e celular de camundongos BALB/c inoculados com essa proteína e desafiados com o parasita *L. chagasi*. Este trabalho mostrou reatividade da proteína A2-L no ELISA-teste para diagnóstico da LVC, e obtiveram-se, dentre os soros de cães naturalmente infectados testados, 64% de positividade. Acredita-se que esse resultado possa estar correlacionado com o estágio da doença, uma vez que não havia, entre as amostras testadas, a classificação sobre os animais sintomáticos e/ou assintomáticos desse experimento. Outro ponto relevante que se deve considerar é a reação cruzada com outras espécies do parasita, uma vez que não há confirmação sobre qual espécie estava

parasitando os animais, podendo ter animais infectados com formas de *L. braziliensis*, por exemplo, que não produz a proteína A2 e, portanto, seriam negativos no ELISA_A2-L. O trabalho de Porrozzi *et. al.* (2007) demonstraram que a proteína A2 foi mais eficaz em detectar positividade em soro de animais assintomáticos. Outro ponto relevante é o tamanho da proteína A2-L expressa, utilizada neste trabalho, de menor peso molecular em relação às outras proteínas dessa família; pode-se supor que, por ser menor, tenha menor quantidade de epítomos disponíveis na detecção da resposta humoral. Outra questão que se pode inferir é a fase da infecção com produção da proteína A2-L pelas formas amastigotas. Portanto, mais estudos sobre a resposta humoral, utilizando-se a proteína recombinante A2-L, devem ser feitos a fim de otimizar os testes sorológicos.

Porrozzi *et. al.* (2007) mostraram que testes sorológicos, utilizando-se proteína recombinante rK39 e rK26 (ambas de *L. chagasi*), foram mais eficientes em identificar cães sintomáticos, enquanto rA2 (de *L. donovani*) foi mais eficiente em detectar cães assintomáticos. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que o ELISA, utilizando-se antígeno bruto, detectou apenas 30% dos cães assintomáticos, enquanto o ELISA, baseado nos antígenos recombinantes rA2, rK39 e rK26, detectou, respectivamente, 88%, 66% e 66%.

Ao se avaliar a proporção das subclasses das imunoglobulinas IgG2a/IgG1, nos camundongos, utilizando-se o ELISA teste com antígeno solúvel total para os grupos G2, G3 e G4, observou-se um padrão similar entre IgG2a e IgG1 em relação ao grupo G1, o qual teve uma resposta dirigida para IgG1. Em cães, essa resposta difere dos resultados do presente estudo, pois Oliveira *et. al.* (2009) mostraram a resposta humoral em cães com leishmaniose visceral, verificando-se que cães assintomáticos apresentaram maior produção de IgG1, enquanto cães sintomáticos apresentaram uma concentração muito semelhante de todas as subclasses, IgG2, IgG1, IgG3 e IgG4, em ordem decrescente, respectivamente.

A imunogenicidade da proteína recombinante A2-L foi evidenciada pelo soro dos animais dos grupos G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). Ambos os grupos (G1 e G3) apresentaram altos níveis de anticorpos anti- A2-L, tanto para a classe IgG quanto para as subclasses IgG1 e

IgG2a, portanto, não definiu um padrão de resposta Th1/Th2. Neste presente estudo, detectou-se diferença em relação à produção de IgG total anti-*Leishmania*, tanto pelo ELISA quanto pela RIFI. O grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) produziu títulos de anticorpos mais elevados do que aqueles do grupo G3, diferença comprovada estatisticamente ($p < 0,05$). Alguns trabalhos demonstram que níveis muito altos de anticorpos podem causar efeitos deletérios na infecção por *Leishmania*, contribuindo, inclusive, para a progressão da doença (KIMA *et. al.*, 2000). Entretanto, Carrión *et. al.* (2006), ao inocularem BALB/c com 10^6 promastigotas de *L. chagasi*, verificaram que não houve resposta imune humoral intensa e, ainda, concluíram que anticorpos anti-*Leishmania* não eram essenciais na resposta imune contra o parasita, concordando com outros autores (RHALEM *et. al.*, 1999; EVANS *et. al.*, 1990; ABRANCHES *et. al.*, 1991).

Trabalhos utilizando modelos murinos infectados com *L. major* demonstraram uma correlação entre susceptibilidade e resposta imune do tipo Th1, resistência e resposta imune do tipo Th2 (BRETSCHER *et. al.*, 1992; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002). Apesar de trabalhos com *L. major* serem mais frequentes, alguns autores consideram que o mesmo perfil de resposta pode ser esperado para infecções murinas com *L. chagasi* e *L. donovani* (HONORE *et. al.*, 1998; ROLÃO *et. al.*, 2007). Outros autores, entretanto, sugerem que a susceptibilidade à infecção tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. chagasi*, parece ser devida a uma resposta Th1 pouco eficiente do que a uma resposta Th2 exacerbada (AFONSO e SCOTT, 1993; SOONG, *et. al.*, 1997). Já, Gosh *et. al.* (2001) em seu trabalho, estabelecem que a imunização com A2 resulta em um mix de resposta Th1/Th2, o qual confere proteção contra infecções por *L. donovani*.

Apesar do grupo G1 expressar maior quantidade de anticorpos anti-IgG total, a população de linfócitos B, observados pela imuno-histoquímica, não demonstrou diferença significativa entre os grupos G1 e G3, mas ambos apresentaram porcentagem significativamente maior de linfócitos B do que o grupo controle G4 e do que o grupo G2. Essa observação demonstra que o aumento na produção de linfócitos B foi estimulado pelo parasita e não pela proteína recombinante A2-L. Isso aconteceu tanto nos fragmentos de baço quanto nos do linfonodo. O papel dos linfócitos B ainda não está bem definido. Trabalhos recentes demonstraram que uma

resistência acentuada contra a leishmaniose visceral foi observada em camundongos mutantes, os quais não tinham células B maduras (SMELT *et. al.*, 2000). Em cães com leishmaniose, Barbiéri *et. al.* (2006) descreveram, que quando ocorre resposta do tipo Th2, há proliferação de linfócitos B e produção das citocinas IL-4 e IL-10, as quais promovem uma plasmocitose e, conseqüentemente, uma hipergamaglobulinemia com formação de imunocomplexos, que acaba resultando em uma resposta humoral ineficiente.

O linfonodo do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) apresentou maior expressão de células T CD8⁺. Esse resultado foi confirmado tanto pela técnica de citometria de fluxo quanto pela técnica de imuno-histoquímica. Assim como o grupo G3, o G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L) também apresentou maior expressão destas células, conforme resultados da citometria de fluxo. Logo, pode-se concluir que o estímulo para esse aumento foi induzido pela proteína recombinante A2-L e não pelo parasita. Em camundongos BALB/c, o controle da LV tem sido associado em respostas imunes envolvendo células CD4⁺ e CD8⁺, a produção de IFN- γ pelas células esplênicas e a formação de granulomas (AHMED *et. al.*, 2003; KAYE e SCOTT, 2011). Não se verificou diferença significativa na produção de células expressando CD4⁺ entre os grupos G1 e G3, mas ambos foram estatisticamente mais significantes do que o grupo controle (G4). O papel das células T CD4⁺ está correlacionado ao fato delas gerarem IFN- γ , o qual ativa macrófagos parasitados a eliminar a *Leishmania* intracelular (LIEW *et. al.*, 1989; MOSMANN e COFFMAN, 1989; HEINZEL *et. al.*, 1991). Outros trabalhos também destacaram a importância dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺, induzidos pela imunização com proteínas recombinantes na proteção contra *L. chagasi* (FEDELI *et. al.*, 2010; RESENDE *et. al.*, 2008).

Em consonância com os resultados apresentados neste trabalho para as células T CD4⁺ e CD8⁺, estão os achados das imunomarcações dos Complexos Principais de Histocompatibilidade (MHC) I e II. Sendo que, o linfonodo do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) apresentou percentual significativamente maior do que todos os outros grupos de células expressando moléculas de MHC classe I e II.

Entretanto, o aumento na expressão dessas moléculas não foi acompanhado, no caso, pelo grupo G2, o que faz acreditar que o estímulo, embora tenha ocorrido com significativa diferença no grupo G3, não tenha sido desencadeado pela proteína recombinante A2-L. No baço, apesar de não apresentar diferença significativa entre os grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), G3 e G4 (controle), o G3 apresentou maior imunomarcção que os demais para MHC I. Em macrófagos, infectados com *L. major*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, já ficou demonstrado que a apresentação por moléculas de MHC classe I induz a expressão de CD8⁺ (CONCEIÇÃO-SILVA *et. al.*, 1994; PINELLI *et. al.*, 1995; KIMA *et. al.*, 1997). Quanto à expressão de moléculas MHC classe II, no baço, não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G3, porém ambos apresentaram percentual significativamente maior do que o grupo controle G4. Também não houve diferença entre os grupos em relação à produção de células CD4⁺, para ambos os órgãos analisados, tanto pela imuno-histoquímica quanto pela citometria de fluxo.

A imunomarcção de células, expressando a enzima iNOS, novamente se sobressaiu em linfonodo do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*). O grupo G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), apesar de não apresentar diferença significativa, a produção foi visivelmente maior do que o grupo G1, podendo-se inferir que tal aumento tenha sido causado pela inoculação da proteína recombinante A2-L. No baço, apesar do grupo G3 apresentar maior porcentagem de imunomarcção para iNOS do que o grupo G1, não houve diferença significativa entre ambos e, tanto G1 como G3 apresentaram porcentagem significativamente maior do que a do grupo controle G4. O grupo G2, também no baço, apresentou mesmo percentual do grupo G4. A produção da enzima Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) pode ser estimulada por citocinas e IFN- γ (MICHEL *et. al.*, 1997; NATHAN *et. al.*, 1997) a qual, em camundongos, estimula uma resposta do tipo Th1 que estimula a morte do parasita pela produção de Óxido Nítrico (NO) (LIEW *et. al.*, 1990).

Os macrófagos que deveriam ter o papel de destruir as leishmanias acabam tornando-se o hábitat deste parasita. Estudo *in vivo* em hamsters com leishmaniose visceral observou que ocorre apoptose induzida pelo próprio macrófago na fase

inicial da infecção. Entretanto, com o progresso da doença, desaparece a apoptose de ambos os órgãos, baço e fígado, o que sugere um mecanismo de escape por parte do parasita que impede que seu novo habitat seja destruído (LINDOSO, 2001; MOORE e MATLASHEWSKI, 1994). Neste trabalho, não se verificou diferença significativa entre os grupos G1, G3 em relação ao grupo controle G4, tanto para o baço quanto para o linfonodo, na porcentagem de imunomarcção de macrófagos. Sendo ainda que, para o grupo G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), no baço, a produção de macrófagos, ficou abaixo dos grupos G1 e G3, com significativa diferença. A supressão mediada de macrófagos além de estar relacionada ao aumento de parasitas, parece também estar relacionada à sua capacidade de apresentação, suprimindo ambas as moléculas, MHC classes I e II (MURRAY *et. al.* 1986; REINER *et. al.*, 1987; SAHA *et. al.*, 1995). Entretanto, como foi descrito anteriormente, apesar de não haver diferença na porcentagem de macrófagos entre os grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*), o grupo G3 apresentou, no linfonodo, porcentagem significativamente maior de iNOS, assim como de ambas as moléculas MHC, classes I e II, do que o grupo G1. Portanto, pode-se inferir que, apesar de haver mesma quantidade de macrófagos nos grupos G1 e G3, a população celular desse último grupo encontrava-se em plena atividade contra o parasita, enquanto no grupo G1 parece não haver resposta do macrófago contra o parasita.

A avaliação da expressão das citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10 e IL-4 realizada em tecidos de baço e linfonodos em todos os grupos experimentais tanto pela técnica de ELISA quanto pela técnica de PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR). Entretanto, será discutido com maior profundidade este último, já que o ELISA não apresentou diferenças significativas estatisticamente entre os grupos e, inclusive, não se observou a detecção das citocinas. O qPCR detecta facilmente transcritos de RNA mensageiro, sendo que, muitas vezes, a proteína correspondente mal consegue ser mensurada por outras técnicas. Essa pode ser considerada uma das grandes vantagens do qPCR.

Neste estudo, a produção de IFN- γ no baço do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*)

foi significativamente maior do que nos grupos G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*) e G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L). Esses dados estão de acordo com os resultados da imunohistoquímica em que o mesmo grupo apresentou maior porcentagem de células T CD8⁺. Também as produções de IL-2, IL-4 e TNF- α , no baço, apresentaram-se maior no grupo G3 do que nos grupos G1 e G2. Entretanto, a produção de IL-4 apresentou menor média do que as outras citocinas. Apenas a produção de IL-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Alguns autores sugerem que a participação de IFN- γ seja responsável pela eliminação do parasita (KAYE *et. al.*, 1991), embora sozinho possa não ser eficiente (LEAL, *et. al.* 2014). Mas já é conhecido o seu potencial ativador de macrófagos para fagocitose e destruição de parasita, no caso de infecções por *Leishmania* (BOGDAN *et. al.*, 1990; FARRELL, 2002).

Trabalhos em cães com LV caracterizam uma resposta celular similar àquela encontrada nos camundongos BALB/c infectados pelo mesmo parasita, em que cães resistentes apresentam um perfil de resposta Th1 com maior presença de IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Enquanto cães susceptíveis demonstram um perfil de resposta Th2 com maior concentração de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (PINELLI *et. al.*, 1994; LAGE *et. al.*, 2007; MENEZES-SOUZA *et. al.*, 2011). A exceção é observada em relação à IL-4 que, em camundongos, não está associada à susceptibilidade da doença (GOTO e LINDOSO, 2004).

Vale ressaltar que Zanin *et. al.* (2007), no trabalho sobre eficácia de vacina de A2 e DNA NH em camundongos BALB/c contra infecções por *L. amazonensis* ou *L. chagasi*, afirmaram que altas produções de IFN- γ e baixas produções de IL-4 e IL-10 são necessárias para a proteção contra os parasitas. Neste trabalho, apesar de não apresentar diferença significativa, o grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) apresentou, no baço, elevada produção de IL-10. Porém, o mesmo não ocorreu para o grupo G2 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L), que se manteve muito baixo; concluímos que esse aumento no grupo G3 não foi estimulado pela proteína recombinante A2-L e, sim, pelo parasita. Corroborando essa afirmativa, no linfonodo, apesar também de não haver diferença significativa, o grupo G1 (animais inoculados

com promastigotas de *L. chagasi*) apresentou maior produção quando se observa o gráfico. No entanto, alguns pesquisadores questionam o papel da IL-4 em modelos experimentais com leishmaniose cutânea (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002). Outros autores também atribuem à IL-4, durante infecção por *L. donovani*, a indução de produção de IFN- γ e, por sua vez, de células T CD8⁺, assim como o desenvolvimento de granulomas hepáticos e atividade anti-leishmania (HUANG *et. al.*, 2000; STAGER *et. al.*, 2000). A IL-10 é conhecida por contribuir para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (BARRAL *et. al.*, 1993; BOGDAN e NATHAN, 1993; STENGER *et. al.*, 1994). Wilson *et. al.* (1998) relataram que camundongos BALB/c imunizados e infectados com *L. chagasi* tiveram um aumento tanto de IFN- γ quanto de IL-10. E a co-existência de ambas as citocinas tem sido demonstrada também em LV humana (KARP *et. al.*, 1993; KENNEY *et. al.*, 1998; KEMP *et. al.*, 1999). No entanto, no trabalho de Rolão *et. al.* (2007) também se observou uma correlação entre a produção de IL-10 e IFN- γ , sendo justificado como um possível controle de interleucinas por um mecanismo de *feedback*.

No linfonodo, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, quanto à produção das citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10), além da concentração de todas terem sido muito menores do que as encontradas no baço.

Foi destacado que o grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*), não apresentou alta produção de IL-4 tampouco de IL-10, tanto no baço quanto no linfonodo, o que seria esperado em uma resposta imune do tipo Th1. Tampouco apresentou alta produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, o que se supõe uma resposta imune do tipo Th1. Os resultados deste trabalho levam a concluir que o padrão de resposta Th1 e Th2 não é suficiente para explicar a susceptibilidade ou resistência ao parasita *L. chagasi* na infecção de modelos experimentais como o BALB/c, concordante com resultados de vários autores (HONORE *et. al.*, 1998; MELBY *et. al.*, 2001; MARQUES *et. al.*, 2005; ROLÃO *et. al.*, 2007).

Os dados da carga parasitária pela qPCR caracterizada neste trabalho demonstra que a imunização com a proteína recombinante A2-L foi capaz de induzir proteção contra os parasitas, uma vez que se verificou significativa redução ($p < 0,05$) da carga parasitária no baço do grupo G3 (animais imunizados com a proteína recombinante A2-L e desafiados com promastigotas de *L. chagasi*) em

comparação ao baço do grupo G1 (animais inoculados com promastigotas de *L. chagasi*). Outro ponto relevante deste trabalho foi a detecção pela técnica de PCR em Tempo Real, do DNA do parasita nas amostras do baço, o que não ocorreu quando foi utilizada a técnica de PCR convencional. Além disso, foi proposta uma metodologia utilizando o mesmo material da PCR convencional, apenas acrescentando um corante fluorescente de baixo custo. A sensibilidade desta técnica, o qPCR, tem sido reconhecida principalmente quando diagnósticos precoces são essenciais para iniciar tratamentos. Essa técnica também tem sido utilizada para quantificar a carga parasitária e avaliar drogas anti-*Leishmania* (BRETAGNE et. al., 2001; NICOLAS et. al., 2002; GARNIER et. al., 2007; REIMÃO et. al., 2011). Outros trabalhos de estudos vacinais, em camundongos BALB/c, contra LV utilizando a proteína recombinante A2 de *L. donovani*, demonstram sua eficácia na proteção contra infecção com reduzida carga parasitária (ZANIN et. al., 2007; RESENDE et. al., 2008; MIZBANI et. al., 2010).

7. Conclusões

- Camundongos imunizados e desafiados (grupo G3) apresentaram uma resposta humoral IgG1 similar a IgG2a, enquanto camundongos apenas inoculados com o parasita (grupo G1) apresentaram uma resposta humoral tendendo a IgG1.
- A imunização de camundongos BALB/c, com a proteína recombinante A2-L mostrou ser imunogênica e antigênica.
- O PCR em Tempo Real (qPCR) mostrou-se mais sensível do que o ELISA. O qPCR permitiu a detecção de citocinas mesmo em baixos níveis de expressão, enquanto o ELISA, em alguns casos, não conseguiu detectar a presença de citocinas.
- O baço foi o órgão em que melhor foram detectadas citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10) com diferenças significantes entre os grupos, entretanto, o linfonodo foi o melhor órgão para análise de imunomarcações (CD4⁺, CD8⁺, MHC I, MHC II, iNOS, linfócitos B e macrófagos).
- A imunização com a proteína recombinante A2-L foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária no baço dos camundongos imunizados e desafiados com *L. chagasi*.
- Os resultados deste trabalho abrem perspectivas para o uso dessa proteína recombinante (A2-L) em novos trabalhos de imunizações contra o parasita *Leishmania chagasi*.

8. Referências

- ABBAS, A.B.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 580p.
- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.13, p. 537-550, 1991.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, Jul, p. 2952-9. 1993.
- AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. **J Parasitol.**, v. 86, n. 4, p. 730-5, 2000.
- AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 71: 401-410, 2003.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (Th)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett**, v.99, n.1, Jun 15, p.17-23. 2005.
- ARIAS, R. J.; MONTEIRO, S.P.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, n.2, 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n.6, p. 238-258, 2004.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 90, n. 8, p. 3442-6, 1993.
- BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol**. v. 20, n. 5, p. 1131-5, 1990.

BOGDAN, C.; NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 685, p. 713-39, 1993.

BORJA-CABRERA, G.P. CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante-RN). **Vaccine**, 20, p.3277-3284, 2002.

BRETAGNE, S., DURAND, R., OLIVI, M., GARIN, J.F., SULAHIAN, A., RIVOLLET, D., VIDAUD, M., DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 828–831, 2001.

BRETSCHER, P.A.; WEI, G.; MENON, J.N.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. **Science**. v. 257, n. 5069, p. 539-42, 1992.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol**, v.1, n.8, Aug, p.1457-67. 2001.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CAMPINO, L.M. Canine reservoirs and Leishmaniasis: Epidemiology and disease. In: FARRELL, J.P. **World Class Parasites: volume 4 Leishmania**. Norwell: Kluwer Academic, 2002 p. 45-57.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* specific kinetoplastid primers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 128, p. 67–70, 2009.

CARRIÓN, J., NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunol**, v.28, n.5, May, p.173-83. 2006.

CARVALHO, F.A.A. *et. al.* Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 43, p.289-295, 2002.

CARTER, K.C. SUNDAR, S.; SPICKETT, C.; PEREIRA, O.C.; MULLEN, A.B. The in vivo susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, p. 1529-35, 2003.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar)**. 2 ed. Brasília: Fundação nacional de saúde, 1996, 88p.

CHANG, K.P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v.30, n.2, p322-333, 1981.

CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n.5, p. 2975-2984, 1994.

CROFT, S.I. Recent development in the chemotherapy of leishmaniasis. **Trends Pharmacol Sci**, v. 9, p. 376-81, 1988.

CONCEICAO-SILVA, F.; PERLAZA, B.L.; LOUIS, J.A.; ROMERO, P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 11, p. 2813-7, 1994.

CORREA, A.P.; DOSSI, A.C.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; MUNARI, D.P., DELIMA, V.M. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.** v. 143, p. 267-274, 2007.

ENGWERDA, C. R., ATO, M.; KAYE, P.M.. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitology**, v.20, n.11, Nov, p.524-30. 2004.

EVANS, T.G.; SMITH, D.; PEARSON, R.D. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 212-217, 1990.

FEDELI C.E.C., FERREIRA J.H.L., MUSSALEM J.S., LONGO-MAUGÉRI I.M., GENTIL L.G., SANTOS M.R.M., KATZ S., BARBIÉRI C.L. Partial protective responses induced by a recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p.153-158, 2010.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.S; COELHO, E.A.F.; MICHALICK, M.S.M.; DE FREITAS, E.; MELO, M.N. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, p. 5888-95, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Boletim epidemiológico**. ano11, 1999. Edição especial Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs>>. Acesso em 06 fev. 2004.

GARNIER, T., MÄNTYLÄ, A., JÄRVINEN, T., LAWRENCE, J., BROWN, M., CROFT, S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 60, p. 802–810, 2007.

GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J Clin Invest**. v. 92, n. 1, p. 324-9, 1993.

GHEDIN, E.; ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R.T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.

GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 59-66, 2001.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; ROLÃO, N.; ALMEIDA, P.D.; SANTOS-GOMES, G.M. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 59-68, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 615–623, 2004.

HANDMAN E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, p. 229–243, 2001.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 88, n. 16, p. 7011-5, 1991.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **J Infect.**, v. 39, n. 2p. 101-11, 1999.

HONORÉ, S.; GARIN, Y.J.; SULAHIAN, A.; GANGNEUX, J.P.; DEROUIN, F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 231–239, 1998.

HUANG LR, CHEN FL, CHEN YT, LIN YM, KUNG JT. Potent induction of long-term CD8+ T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, n. 7, p. 3406–11, 2000.

JUSI, M.M.G.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NAKAGHI, A.C.H.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Expression of a recombinant protein, A2 family, from *Leishmania infantum* (Jaboticabal strain) and its evaluation in Canine Visceral Leishmaniasis serological test, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2015.

KARP CL, EL-SAFI SH, WYNN TA, SATTI MM, KORDOFANI AM, HASHIM FA, HAG-ALI M, NEVA FA, NUTMAN TB, SACKS DL. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J Clin Invest.**, v. 91, n. 4, p. 1644-8, 1993.

KAYE, P.M.; CURRY, A.J.; BLACKWELL, J.M. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 8, p. 2763–70, 1991.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J.A.; HVIID, L.; THEANDER, T.G. *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.** v. 116, n. 3, p. 500-4, 1999.

KENNEY, R.T.; SACKS, D.L.; GAM, A.A.; MURRAY, H.W.; SUNDAR, S. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **J Infect Dis.**, v. 177, n. 3, p. 815-8, 1998.

KIMA, P.E.; RUDDLE, N.H.; MCMAHON-PRATT, D. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8+ T cells. **J Immunol.**, v. 159, n. 4, p. 1828-34, 1997.

KIMA, P.E.; CONSTANT, S.L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K.S.; HABERMAN, A.M.; SHLOMCHIK, M.J.; MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med.**, v.191, n. 6, p. 1063-8, 2000.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile inspleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet.Immunol. Immunopathol.** v. 115, p. 135–145, 2007.

LEAL, G.G.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARNEIROA, C.M.; GIUNCHETTIA, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.;

FRANCISCO, A.F.; CARDOSO, J.M.; MATHIAS, F.A.S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS A.B. Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 472–482, 2014.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUCK, R.; CHAN, W.L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon- γ from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)-3 and IL-4 produced by disease promoting T cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, p. 1227-1232, 1989.

LIEW FY, LI Y, MILLOTT S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v. 71, p. 556–559, 1990.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Adv Parasitol.**, v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, V.M.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.; FEITOSA, M.M. Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**. v. 36, n. 4, p. 485-9, 2003.

LINDOSO, J.A.L. **Apoptose na evolução da leishmaniose visceral experimental em hamster**. 2001. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

MACHADO, R.Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p.17-26, 1997.

MALAFAIA, G.; SERAFIM, T.D.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; REZENDE, S.A. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. **Parasite Immunol**. v. 31, n. 1, p. 41-9, 2009.

MARQUES, C.S.; ROLÃO, N.; CENTENO-LIMA, S.; LOUSADA, H.; MAIA, C.; CAMPINO, L.; DO ROSÁRIO, V.E.; SILVEIRA, H. Studies in a co-infection murine model of *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *Leishmania infantum*: interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, n. 8, p. 889-92, 2005.

MELBY, P.C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J.E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**, v. 166, p. 1912–1920, 2001.

MENEZES-SOUZA, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C.; REIS, A.B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasitol.** v. 177, p. 39–49, 2011.

MICHALSKY, E.M.; FORTES-DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.; SECUNDINO, N.F.; DIAS, E.S. ASSESSMENT of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev.I Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric Oxide Synthases: Which, where, how and why? *Journal of Clinical Investigation*, v. 100, n. 9, p. 2146-2152, 1997.

MILES, S.A.; CONRAD, S.M.; ALVES, R.G.; JERONIMO, S.M.B.; MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med.**, v. 201, n. 5, p. 747-54, 2005.

MIZBANIA, A.; TAHERIA, T.; ZAHEDIFARDA, F.; TASLIMIA, Y.; AZIZIA, H.; AZADMANESH, K.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, p. 53–62, 2010.

MOORE, K.; MATLASHEWSKI, G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 2930-2937, 1994.

MURRAY, H.W.; CARRIERO, S.M.; DONELLY, D.M. Presence of a macrophage-mediated suppressor cell mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 487-493, 1986.

MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M.; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. **J Immunol.** v. 138, n. 7, p. 2290-7, 1987.

MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J Immunol.**, v. 148, n. 6, p. 1858-63, 1992.

MCCALL, L.I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Molecular Microbiology**, v.77, n.2, p. 518-530, 2010.

MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, F.D.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.62, n.3, Mar, p.1058-63. 1994.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect Immun**. v. 70, n. 11, p. 6284-93, 2002.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-73, 1989.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; WRIGHT, S.D. Immunochemotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection: γ -interferon plus pentavalent antimony. **J. Infec Dis.**, v. 157, p. 973-8, 1988.

McELRATH, M.J.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1927-1937, 1988.

MURRAY, H.W.; MIRALLES G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 151, p.929-938, 1993.

NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 40, p. 1666–1669, 2002.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11^a. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2006. p. 41-83.

NATHAN, C. Inducible Nitric Oxide Synthase: What difference it make? **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2417-2423, 1997.

OLIVEIRA, T. M. F. S., FURUTA, P. I., CARVALHO, D., MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA, T.M.F.S.; MINEO, T.W.P.; BASON, M.; DAY, M.J.; MACHADO, R.Z. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 16–22, 2009.

OLIVEIRA, T.M.F.S.; VASCONCELOS, E.J.R.; NAKAGHI, A.C.H.; DEFINA, T.P.A.; JUSI, M.M.G.; BALDANI, C.D.; CRUZ, A.K.; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found

in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 1, p. 42-48, 2011a.

OLIVEIRA, D.M.; COSTA, M.A.F.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; SOTO, M.; TAVARES, A.P.; COELHO, E.A.F. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. **Parasitology Research**. DOI 10.1007/s00436-011-2628-5, 2011b.

OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; WAER, M.; MATHIEU, C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. **Cytokine**, v. 11, n. 4, p. 305-312, 1999.

PALATNIK DE SOUSA, C.B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 7, p.53-59, 2001.

PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.*, v. 127, n.4, p.1438-1443, 1981.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol Rev**. v. 213, p. 159-79, 2006.

PINELLI, A.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection And Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E., GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; BROEREN, C.P.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, v. 49, p. 696-699, 1999.

DE PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M.A.; ALVES, C.R.; BRAZIL, R.P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v. 107, n. 1, p. 66-9, 2008.

PORROZZI R, SANTOS DA COSTA MV, TEVA A, FALQUETO A, FERREIRA AL, DOS SANTOS C, FERNANDES AP, GAZZINELLI RT, CAMPOS-NETO A, GRIMALDI GJR. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* Visceral Infections in Dogs. **Clin. And Vac. Immunol.**, v.14, n. 5, p. 544-548, 2007.

PRAKASH, J.A.J.; RELLER, M.E.; BARAT, N.; DUMLER, J.S. Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 292-293, 2009.

REIMÃO, J.Q., COLOMBO, F.A., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., TEMPONE, A.G. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. **Experimental Parasitology**, n. 128, p. 111–115, 2011.

REINER, N.E.; NG, W.; MCMASTER, W.R; Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 1926-1932, 1987.

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu Rev Immunol.** v. 13, p. 151-77, 1995.

REQUENA, J.M.; SOTO, M.; DORIA, M.D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 76, p. 269–281, 2000.

RESENDE, D.M.; CAETANO, B.C.; DUTRA, M.S.; PENIDO, M.L.O.; ABRANTES, C.F.; VERLY, R.M.; RESENDE, J.M.; PILO-VELOSO, D.; RESENDE, S.A.; BRUNA-ROMERO, O.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8+ T cells. **Vaccine**, v. 26, p. 4585-4593, 2008.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Microbiology**, v. 2, n. 1, 2012.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.81, p. 173-184, 1999.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, V. 115, P. 270-276, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.214 a 240, 2001.

- SACKS, D.L.; MELBY, P.C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol.**, v. 19, n. 19.2, 2001.
- SACKS, D.; THAUTH, N. N. The Immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, **Nat Rev immunol.** n.2, p.845-858, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A LABORATORY MANUAL**, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.
- SANGER, F; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SANTA ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I.; Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.2, n.11, 1997.
- SARTORI, A.; OLIVEIRA, A.V.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; ROSSI, M.A.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasitol Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 93-103, 1987.
- SOONG, L.; CHANG, C.H.; SUN, J.; LONGLEY, B.J.JR; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; PRATT, D.M.M. Role of CD4+ T Cells in Pathogenesis Associated with *Leishmania amazonensis* Infection. **The Journal of Immunology**, p. 5374-5383, 1997.
- STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med.** v. 180, n. 3, p. 783-93, 1994.
- STERN, J.J.; OCA, M.J.; RUBIN, B.Y.; ANDERSON, S.L.; MURRAY, H.W. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol.** v. 140, n. 11, p. 3971-7, 1988.
- STRAUSS, A.I.D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last update: 26-Sep-2001) In: **RECENT Advances in Canine Infectious Diseases**, carmichael L. (Ed.). Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/baneth/. Acesso em: 02/05/2004.
- SUNDAR, S.; MORE, D.K.; SINGH, M.K.; SINGH, V.P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin. Infect. Dis.** v. 31, p. 1104-7, 2000.
- SAHA, B.; DAS, G.; VOHRA, H.; GANGULY, N.K.; MISHRA, G.C. Macrophage- T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 2492-2498, 1995.

SMELT, S.C.; COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. B cell deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3681-3688, 2000.

STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v. 165, n. 12, p. 7064-71, 2000.

TRAVI, B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-IERMA, J.; ADLER, G.H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, Londres, p. 83-86, 72, 2002.

TRINCHIERI, G.; KUBIN, M.; BELLONE, G.; CASSATELLA, M.A. Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity. **J Cell Biochem**. v. 53, n. 4, p. 301-8, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 239-243, 2007.

TRIPATHI P, SINGH V, NAIK S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 51, n. 2, p. 229-42, 2007.

TUMANG MC¹, KEOGH C, MOLDAWER LL, HELFGOTT DC, TEITELBAUM R, HARIPRASHAD J, MURRAY HW. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**. v. 153, n. 2, p. 768-75, 1994.

VAN DER VEEN, R. C. Nitric oxide and T helper cell immunity. **Int Immunopharmacol**, v.1, n.8, Aug, p.1491-500. 2001.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034, 2002.

WERKHAUSER, M. Vacina anti-leishmaniose em foco (prevenção). **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 49, p. 21, 2004.

WILSON, M. E., YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B.L.; MENTE, K.A.; MCGOWAN, S.E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v.161, n.11, Dec 1, p.6148-55. 1998.

WILSON, M. E., JERONIMO, S. M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, v.38, n.4, Apr, p.147-60. 2005.

YAZDANBAKHSH, M.; SACKS, D.L. Why does immunity to parasites take so long to develop? **Nat Rev Immunol**. v. 10, n. 2, p. 80-1, 2010.

ZANIN, F.H.C.; COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; SILVA COSTA, M.M.; REZENDE, S.A. 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.**, 9:1070-7, 2007.

ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; GHEDIN, E.; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 78:79-90, 1996.

ANEXO 1. * AST – Antígeno Solúvel Total

Animal	DO (ELISA_AST)	DO (ELISA_A2-L)	Animal	DO (ELISA_AST)	DO (ELISA_A2-L)	Animal	DO (ELISA_AST)	DO (ELISA_A2-L)
1	2,566	0,633	26	1,484	0,706	50	2,901	0,539
2	1,706	0,417	27	2,312	0,952	51	2,008	0,647
3	1,727	0,542	28	2,918	0,581	52	2,888	0,883
4	1,126	0,518	29	0,962	0,587	53	0,825	0,193
5	1,227	0,186	30	2,574	0,509	54	2,484	0,97
6	1,79	0,376	31	2,509	0,529	55	0,763	0,141
7	1,592	0,29	32	0,347	0,092	56	1,829	0,367
8	0,891	0,224	33	1,777	0,486	57	2,311	0,902
9	1,105	0,663	34	2,62	0,413	58	2,845	0,231
10	2,312	0,704	35	2,069	0,69	59	3,138	0,36
11	0,338	0,33	36	3,009	1,408	60	1,67	0,282
12	1,594	0,561	37	2,168	0,334	62	2,54	0,486
13	2,579	0,805	38	2,92	0,213	63	3,279	1,043
14	0,579	0,137	39	2,612	0,834	64	1,099	0,224
15	1,737	0,559	40	1,872	0,604	65	2,03	0,202
16	2,054	1,668	41	2,589	0,424	66	0,48	0,092
17	0,916	0,601	42	1,248	0,183	67	1,143	0,247
18	2,371	0,664	43	1,947	0,59	68	1,072	0,572
19	1,994	0,553	44	1,087	0,609	69	1,191	0,152
20	1,799	0,575	45	2,126	0,421	70	1,872	0,521
21	1,916	0,192	46	2,182	0,486	71	0,351	0,254
22	2,268	0,171	47	1,999	0,95	72	2,442	0,171
23	2,19	0,491	48	2,646	0,89	73	1,402	0,29
24	2,069	0,613	49	3,09	1,463	74	1,694	0,386

75	0,758	0,127	138	1,504	0,182	167	1,108	0,325
76	1,862	0,535	139	0,691	0,253	168	1,595	0,221
77	2,138	0,254	140	0,387	0,121	169	2,088	0,831
79	2,702	0,196	141	1,511	0,449	170	1,622	0,66
80	0,55	0,206	142	2,372	1,352	171	1,823	0,372
81	2,069	0,578	143	2,112	0,229	172	2,747	1,339
82	1,998	0,423	144	0,332	0,11	173	2,775	0,528
86	0,962	0,273	145	1,228	0,161	175	0,374	0,094
88	0,45	0,19	146	0,471	0,297	179	1,021	0,157
90	1,121	0,333	147	2,09	0,257	189	0,828	0,402
92	2,743	0,463	148	0,773	0,086	203	0,742	0,326
93	0,324	0,139	149	1,93	0,496	218	0,83	0,41
95	1,687	0,314	150	2,198	0,233	227	0,508	0,235
97	1,56	0,509	151	1,488	0,148	232	0,615	1,471
99	2,284	0,536	152	0,435	0,108	233	0,486	0,587
103	0,449	0,179	153	0,832	0,216	234	0,889	0,288
105	1,738	0,261	154	1,503	0,105	266	0,451	0,292
107	1,718	0,301	155	0,448	0,201	272	0,34	0,283
108	2,251	0,358	156	0,442	0,137	273	2,309	0,556
110	2,605	0,323	157	1,337	0,849	274	0,375	0,282
114	0,332	0,116	158	1,625	0,131	275	2,196	0,31
121	0,715	0,322	159	2,414	0,682	276	1,379	0,275
122	2,338	0,541	160	0,781	0,158	279	0,577	0,23
123	1,095	0,705	161	1,703	1,272	280	1,268	0,919
125	2,052	0,283	162	1,134	0,73	281	1,394	0,22
126	1,101	1,137	163	0,569	0,14	282	0,301	0,525
129	1,436	0,146	164	1,621	0,484	283	0,363	0,127
135	3,071	0,232	165	2,435	0,968	284	1,247	0,776
137	1,514	0,747	166	2,627	0,199	285	0,84	0,272

286	1,112	0,219	321	1,529	0,612	363	1,429	0,507
287	0,753	0,256	322	0,435	0,225	364	0,552	0,231
288	2,11	0,309	323	0,446	0,139	365	0,947	0,327
289	1,772	0,256	324	1,28	0,136	366	0,81	0,182
290	0,996	0,387	325	0,506	0,27	367	1,575	0,385
291	2,202	0,431	326	1,317	0,142	368	0,797	0,143
292	1,807	0,449	328	0,312	0,159	369	2,782	0,505
293	0,647	0,237	331	0,354	0,315	370	0,287	0,092
294	2,168	0,246	333	2,591	0,226	371	2,28	0,789
296	2,54	0,606	334	2,943	0,766	372	0,806	0,287
297	0,446	0,26	335	2,401	0,321	373	3,284	0,347
298	2,775	0,718	336	2,423	0,333	375	1,192	0,215
299	0,721	0,195	337	0,437	0,174	376	1,409	0,39
300	1,893	0,26	338	2,359	0,364	377	2,805	0,295
301	1,45	0,28	339	0,745	0,245	378	2,066	0,325
302	2,638	0,203	340	0,629	0,241	379	0,711	0,171
303	1,184	0,269	342	1,847	0,555	380	1,51	0,402
304	0,575	0,29	344	1,035	0,272	381	0,926	0,099
306	0,621	0,448	345	0,587	0,174	382	0,419	0,153
307	0,424	0,335	346	1,244	0,427	383	0,936	0,135
308	0,284	0,613	347	0,455	0,227	384	2,39	0,573
309	0,64	0,293	348	1,939	0,717	385	2,512	0,529
310	1,901	0,577	349	0,741	0,099	386	1,254	0,17
311	0,976	0,501	351	1,119	0,422	387	1,018	0,117
313	2,294	0,295	353	0,304	0,564	388	1,497	0,282
314	0,4	0,16	356	1,476	0,412	389	0,967	0,159
315	0,919	0,447	357	2,774	0,35	390	1,711	0,192
318	0,376	0,261	361	0,598	0,256	392	1,106	0,172
320	0,502	0,147	362	2,719	0,436	394	2,429	0,823

395	1,002	0,246	432	1,322	0,239	472	0,846	0,425
396	0,505	0,169	433	2,512	0,116	473	0,874	0,658
397	3,011	0,15	434	0,743	0,074	474	0,928	0,393
398	3,467	0,314	436	0,405	0,093	475	1,098	0,197
399	1,039	0,258	437	1,559	0,112	476	1,283	1,527
400	1,088	0,297	438	1,684	0,102	477	1,207	1,114
401	1,663	0,149	441	1,961	0,444	479	1,38	0,464
403	2,563	0,683	442	1,16	0,685	480	0,415	0,309
404	2,521	0,677	443	1,828	0,508	481	1,38	0,563
405	1,936	0,143	444	2,288	0,205	482	0,723	0,408
406	0,831	0,172	445	1,961	0,251	483	0,848	0,211
407	0,386	0,459	446	0,737	0,13	484	1,67	0,49
408	3,283	0,299	447	1,282	0,158	486	1,476	0,305
409	1,498	0,243	448	1,626	0,126	488	1,251	0,34
410	1,161	0,117	451	0,534	0,366	489	1,261	0,537
411	0,54	0,094	452	1,758	0,509	491	1,349	0,282
412	0,322	0,122	453	1,299	0,123	492	0,841	0,766
415	0,497	0,094	454	1,237	0,203	493	0,475	0,299
416	2,808	0,195	455	1,325	0,307	495	0,918	0,381
417	2,361	0,13	458	0,806	0,177	496	0,864	0,292
420	1,271	0,096	460	0,875	0,131	497	1,649	0,445
421	1,079	0,236	461	0,991	0,158	498	1,228	0,336
423	2,356	0,143	462	0,773	0,119	499	0,692	0,201
424	1,866	0,118	463	0,648	0,211	500	0,696	0,119
425	2,083	0,276	465	0,655	0,48	503	1,221	0,696
426	2,953	0,399	466	0,826	0,584	504	0,731	0,439
428	2,663	0,151	467	1,267	0,466	505	0,756	0,457
430	0,892	0,192	469	0,635	0,296	507	1,592	0,523
431	1,14	0,228	470	0,78	0,249	508	0,822	0,282

509	1,409	0,326	548	1,104	0,419	589	1,548	0,659
510	0,51	0,131	549	1,62	0,489	590	0,425	0,365
512	1,627	0,235	550	1,251	0,709	591	1,174	0,335
515	0,579	0,405	555	2,112	1,115	592	1,102	0,255
516	1,346	0,515	558	1,763	0,421	595	0,919	0,233
517	1,032	0,461	559	0,776	0,448	596	1,068	0,393
518	1,514	0,273	560	0,913	0,271	598	1,296	0,288
519	0,692	0,267	561	1,555	0,365	599	0,881	0,315
520	1,093	0,143	562	2,195	0,742	602	1,154	0,355
521	1,303	0,865	563	1,257	0,559	603	0,49	0,512
522	1,045	0,379	565	1,309	0,331	605	1,981	0,909
523	0,432	0,806	567	0,61	0,339	606	2,38	0,237
524	0,423	0,109	568	2,118	0,357	607	2,659	1,156
525	1,165	0,259	569	0,375	0,802	608	0,403	0,095
526	1,062	1,33	571	1,132	0,779	609	2,102	0,877
527	1,457	0,316	573	0,737	0,474	610	1,941	0,282
528	1,231	0,525	574	1,644	0,373	612	1,357	0,637
530	1,377	1,01	576	0,425	0,179	614	0,751	0,964
531	1,137	0,312	577	1,54	0,568	615	1,389	0,934
532	0,916	0,292	578	0,964	0,75	617	0,967	1,022
533	1,58	0,941	579	1,489	0,253	618	1,582	0,587
535	0,58	0,361	580	1,986	0,339	619	0,962	0,205
536	2,106	1,046	582	0,689	0,244	620	1,367	0,607
537	0,776	0,225	583	1,036	0,784	622	0,591	0,909
539	0,826	0,474	584	0,586	0,871	625	0,468	0,35
540	0,659	0,556	585	0,853	1,318	626	1,51	0,251
541	2,227	0,399	586	1,294	1,11	627	2,281	0,533
543	1,526	0,125	587	0,733	1,268	628	0,622	0,331
544	1,822	0,192	588	1,43	0,386	630	2,531	1,016

631	3,289	0,483	675	1,498	0,224	712	1,21	0,972
632	3,402	0,447	676	1,973	0,686	714	3,181	0,222
633	1,729	0,465	677	1,422	0,71	715	1,885	1,168
634	1,903	0,742	678	1,929	0,533	41 HV	2,189	0,731
635	3,085	0,797	679	2,893	1,04	716	2,404	0,374
639	1,418	0,285	680	0,632	0,404	717	2,496	0,397
642	2,56	0,724	682	2,202	0,643	718	2,399	0,466
644	0,516	0,366	683	1,669	0,225	720	1,541	0,165
646	1,33	0,59	684	0,459	1,003	722	0,61	0,466
647	2,586	0,643	685	0,727	0,237	723	1,194	0,69
648	2,141	0,436	686	1,285	0,484	724	1,379	0,373
649	3,266	0,662	687	2,219	0,575	727	1,118	0,537
652	0,361	0,567	688	1,704	0,92	728	1,615	0,127
653	0,788	0,301	689	0,985	0,713	732	1,394	0,186
654	2,892	0,294	690	2,584	0,393	741	0,996	0,231
655	0,313	0,206	691	0,972	0,182	742	0,984	0,24
656	0,563	0,315	692	2,547	0,445	745	1,065	0,303
657	1,433	0,459	693	1,736	0,627	747	1,318	0,212
658	0,454	0,204	694	0,679	0,226	748	0,866	0,417
659	0,932	0,141	695	1,758	0,288	750	0,733	0,338
660	2,402	0,704	696	0,822	0,361	754	0,712	0,258
661	2,886	0,478	697	0,431	1,032	757	1,305	0,15
662	1,745	0,292	699	2,399	0,41	760	0,841	0,154
663	1,992	0,775	701	0,451	0,694	764	1,118	0,396
665	0,623	0,202	702	0,735	0,223	766	0,961	0,291
669	2,825	0,992	704	2,752	0,467	770	0,865	0,168
670	2,583	0,855	705	1,655	0,382			
671	2,688	0,441	710	0,364	0,186			
674	1,55	0,411	711	1,029	0,198			

772	0,75	0,379	815	1,134	0,134	854	0,909	0,239
773	1,454	0,196	816	0,791	0,125	855	1,035	0,259
774	0,605	0,385	817	0,373	0,115	856	0,386	0,123
776	0,985	0,24	818	0,819	0,143	857	0,33	0,158
777	1,807	0,384	819	1,161	0,416	858	1,285	0,399
778	1,005	0,444	820	1,013	0,254	859	0,393	0,267
781	0,845	0,132	821	1,377	0,126	861	0,847	0,55
786	0,968	0,244	822	0,732	0,128	862	0,531	0,124
787	1,006	0,139	823	0,745	0,19	863	0,822	0,247
790	1,52	0,131	825	0,768	0,209	865	1,182	2,01
793	0,793	0,318	826	1,077	0,128	868	1,462	0,164
796	0,879	0,213	827	0,612	0,164	869	1,243	0,246
798	0,886	0,166	828	0,427	0,117	872	1,936	0,273
799	0,658	0,487	829	0,462	0,19	873	2,006	0,301
800	1,567	0,181	830	0,576	0,132	876	1,819	0,29
801	1,208	0,123	831	0,927	0,422	877	1,857	0,196
802	0,784	0,132	832	1,044	0,23	878	1,884	0,272
803	1,075	0,246	834	0,9	0,154	879	1,641	0,251
804	1,445	0,425	836	1,852	2,147	880	2,087	0,654
805	0,988	0,152	837	0,831	0,132	881	1,54	0,188
806	1,243	0,921	840	0,762	0,171	882	1,781	0,196
807	0,833	0,254	841	0,963	0,142	883	1,731	0,143
808	1,13	0,924	842	0,624	0,142	884	1,263	0,15
809	0,309	0,12	843	0,714	0,211	886	1,589	0,191
810	0,303	0,219	844	1,348	0,319	887	1,182	0,145
811	0,842	0,194	845	1,339	0,239	889	0,727	0,137
812	0,459	0,146	847	1,284	0,129	890	1,192	0,68
813	0,619	0,124	848	0,34	0,259	891	1,318	0,141
814	1,407	0,115	852	1,029	0,114	892	1,744	0,244

893	0,624	0,211	923	0,851	0,158	954	1,578	0,127
894	2,067	0,646	924	0,689	0,111	955	0,478	0,374
895	1,856	0,273	925	1,014	0,126	956	0,417	0,227
896	1,547	0,189	926	1,573	0,259	957	1,596	0,199
897	1,591	0,111	927	0,346	0,148	958	1,652	0,123
898	1,172	0,164	928	1,347	0,454	959	1,644	1,378
899	1,523	0,225	929	1,776	0,358	960	1,088	0,195
900	1,288	0,555	930	1,435	1,005	961	1,537	0,152
901	0,99	0,145	931	1,421	0,216	962	1,899	0,701
902	0,821	0,383	932	1,496	0,166	963	2,345	0,138
903	1,287	0,669	933	1,695	0,283	964	1,8	0,184
904	2,084	0,214	934	1,616	0,493	965	1,824	0,755
905	0,551	0,175	935	1,019	0,254	966	2,331	1,016
906	1,961	0,166	936	0,727	0,226	967	1,449	0,896
907	1,692	0,175	937	1,431	0,208	968	1,93	0,447
908	1,55	0,16	938	1,315	0,546	969	2,76	0,529
910	1,26	0,293	939	0,731	0,262	970	2,769	0,575
911	0,997	0,284	941	1,251	0,19	971	0,536	0,134
912	0,651	0,638	942	0,309	0,138	972	2,247	0,5
913	1,447	0,15	943	1,545	0,576	973	1,474	0,264
914	0,472	0,144	944	1,049	0,174	974	2,407	0,45
915	0,644	0,186	945	1,767	0,429	975	0,242	0,179
916	1,436	0,211	946	0,918	0,21	977	1,5	0,526
917	0,445	0,112	947	1,24	0,173	978	2,242	0,422
918	1,78	0,603	948	1,123	0,183	979	2,097	0,182
919	1,423	0,208	950	1,652	0,175	980	0,604	0,452
920	0,658	0,288	951	0,384	0,139	981	1,359	0,400
921	1,746	0,313	952	1,013	0,167	982	0,888	0,3
922	0,964	0,163	953	0,543	0,367	983	0,61	0,589

984	1,892	0,234	1014	0,971	0,375	1045	1,406	0,693
985	0,954	0,228	1015	1,188	0,645	1046	1,895	0,409
986	1,978	0,218	1016	0,859	0,968	1047	2,309	0,913
987	0,562	0,239	1017	0,795	0,617	1048	1,01	0,246
988	1,174	0,435	1018	1,508	1,071	1049	1,386	0,448
989	0,487	0,328	1019	2,087	0,581	1050	0,948	0,557
991	1,96	0,303	1020	1,577	0,807	1051	0,555	0,553
992	0,369	0,175	1021	0,386	0,349	1052	1,303	0,229
993	1,501	0,292	1022	0,816	0,41	1053	0,815	1,133
994	0,968	0,286	1023	1,192	0,418	1054	1,609	0,529
995	2,005	0,331	1025	0,887	0,297	1055	0,7	0,294
996	1,807	0,519	1026	1,787	1,004	1056	1,403	0,073
997	0,913	0,315	1027	1,478	1,124	1057	0,899	0,072
998	2,065	0,382	1028	2,096	0,354	1058	1,862	0,54
999	1,661	0,22	1030	0,989	1,035	1059	0,536	0,401
1000	1,741	0,654	1031	2,415	1,32	1060	0,565	0,228
1001	2,098	0,831	1032	0,451	0,342	1061	0,398	0,219
1002	1,788	0,947	1033	2,413	0,48	1062	0,742	0,364
1003	1,562	0,774	1034	1,475	0,306	1063	1,279	0,668
1004	1,79	0,342	1035	2,098	0,627	1064	1,073	0,366
1005	1,811	0,657	1036	1,611	0,863	1065	0,571	0,459
1006	0,433	0,268	1037	1,268	0,979	1066	1,387	0,562
1007	1,854	0,67	1038	1,835	0,928	1067	0,556	0,13
1008	2,276	0,74	1039	0,765	0,314	1068	0,499	0,606
1009	1,393	0,566	1040	2,204	1,154	1070	0,492	0,589
1010	2,315	0,664	1041	2,134	0,41	1071	0,331	0,642
1011	1,165	0,608	1042	1,418	1,254	1072	0,337	0,203
1012	0,634	0,756	1043	1,953	1,161	1074	0,693	0,294
1013	0,866	0,31	1044	1,005	0,808	1075	2,147	0,44

1076	0,679	0,18	1108	1,407	0,343	1138	0,286	0,36
1077	1,71	0,212	1109	0,924	0,773	1139	1,282	0,543
1078	1,224	0,296	1110	0,469	0,254	1144	0,505	0,213
1079	1,398	0,335	1111	0,604	0,488	1146	0,794	0,621
1080	0,343	0,157	1112	1,135	0,713	1147	0,979	0,622
1081	1,306	0,693	1113	0,807	0,582	1148	0,305	0,602
1082	1,364	0,908	1114	0,38	0,37	1149	1,075	0,936
1083	0,879	0,546	1115	0,303	0,225	1150	1,081	0,795
1084	1,382	0,49	1116	0,817	0,39	1151	1,379	0,544
1085	1,025	0,504	1117	1,876	0,374	1152	0,433	0,21
1087	0,434	0,381	1118	0,892	0,718	1153	1,567	0,897
1088	0,973	0,282	1119	0,409	0,299	1155	1,243	0,215
1089	2,462	0,617	1120	0,744	0,523	1156	1,332	0,313
1090	0,969	0,345	1121	0,759	0,347	1157	0,747	0,369
1091	0,679	0,456	1122	0,499	0,453	1158	0,452	0,761
1092	0,586	0,711	1123	1,582	0,677	1159	0,685	0,199
1093	0,897	0,254	1124	1,628	0,793	1161	0,279	0,141
1095	0,305	0,186	1125	1,702	0,874	1163	0,188	0,435
1096	1,447	0,227	1126	0,928	0,374	1165	0,33	0,413
1097	2,071	0,953	1127	1,734	0,529	1166	0,612	0,671
1098	1,308	0,709	1128	0,392	0,247	1167	0,842	0,349
1099	1,249	0,365	1129	0,95	0,383	1168	0,987	0,235
1100	0,626	0,45	1130	1,821	0,299	1169	1,023	0,276
1102	1,747	0,244	1131	1,247	0,292	1171	1,293	0,489
1103	1,411	0,523	1132	0,55	1,021	1172	0,298	0,316
1104	1,337	0,248	1133	0,43	0,424	1173	0,584	0,238
1105	1,035	0,459	1134	1,453	0,389	1174	1,062	0,228
1106	1,312	0,538	1135	1,188	0,843	1175	0,431	0,586
1107	0,172	0,411	1136	0,451	0,239	1176	0,844	0,184

1178	0,316	0,176	1215	1,209	0,23
1179	0,456	0,45	1217	0,994	0,236
1180	0,702	0,667	1219	0,631	0,211
1181	1,075	0,387	1220	0,783	0,806
1182	0,674	0,304	1221	0,363	0,172
1185	0,7	0,225	1224	0,541	0,241
1186	0,25	0,136	1225	0,251	0,187
1188	0,305	0,328			
1189	0,456	0,194			
1190	0,602	0,211			
1191	1,592	0,275			
1192	1,015	0,457			
1194	0,307	0,173			
1195	0,35	0,187			
1197	0,868	0,3			
1198	0,455	0,139			
1199	1,226	0,593			
1200	1,51	0,504			
1201	0,595	0,695			
1202	0,514	0,352			
1204	1,15	0,318			
1205	0,845	0,206			
1207	1,042	0,242			
1208	1,067	0,362			
1209	1,67	0,467			
1210	1,072	0,327			
1211	0,291	0,257			
1212	0,437	0,2			
1214	0,484	0,212			

