

**FACULDADE DE PATOS DE MINAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

RÔMULO DA SILVA OLIVEIRA

**VACINA CONTRA LEISHMANIOSE HUMANA:
Desenvolvimento da Vacina Anti-*Leishmania***

**PATOS DE MINAS
2010**

RÔMULO DA SILVA OLIVEIRA

**VACINA CONTRA LEISHMANIOSE HUMANA:
Desenvolvimento da Vacina *Anti-Leishmania***

Monografia apresentada à Faculdade Patos de Minas como requisito parcial para a conclusão do Curso de Graduação em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a.Sandra R. Afonso Cardoso

**PATOS DE MINAS
2010**

616.993.161 OLIVEIRA, Rômulo da Silva
O48v Vacina contra leishmaniose humana:
desenvolvimento da vacina *anti-leishmania*/
Rômulo da Silva Oliveira-Orientadora: Prof^a.
Sandra R. Afondo Cardoso. Patos de Minas:
[s.n.], 2010 .
39p.: il.

Monografia de Graduação – Faculdade
Patos de Minas – FPM
Curso de Bacharel em Biomedicina

1.Vacina *anti-leishmania* 2.Leishmaniose
3.Vacina I.Rômulo da Silva Oliveira II.Título

RÔMULO DA SILVA OLIVEIRA

VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE HUMANA:
Desenvolvimento da Vacina Anti-*Leishmania*

Monografia aprovada em 05 de novembro de 2010, pela comissão examinadora constituída pelos professores:

Orientador: _____
Prof. Dra. Sandra R. Afonso Cardoso
Faculdade Patos de Minas

Examinador: _____
Prof. Esp. Alexandre Ricardi
Faculdade Patos de Minas

Examinador: _____
Prof. Ms. Taciano dos Reis Cardoso
Faculdade Patos de Minas

AGRADECIMENTOS

Expresso o meu agradecimento a todos que contribuíram de uma forma direta ou indireta para a realização desta pesquisa. De forma especial a Deus pelo dom da vida, pois sem ele este trabalho não seria possível. De forma carinhosa, agradeço aos meus pais, Paulo e Maria, pela compreensão e o apoio incondicional dedicado a mim durante esta trajetória. O meu afeto também aos meus irmãos que nesta caminhada souberam ser amigos. Com vocês compartilho a esperança de dias melhores.

A meu tio Leodoro, e meu padrinho Nitsuo e madrinha Fumie por terem acompanhado essa jornada. As minhas professoras Sandra e Nayara, obrigado pela paciência e dedicação nos momentos mais difíceis. A todos os colegas de sala, pela presença incondicional que foi de fundamental importância para a realização do meu trabalho, porque além de partilharmos conhecimentos, também dividimos amizades verdadeiras, coleguismo e parceria. A vida seguirá, mas o orgulho de ter todos gravados não apenas na memória, mas na alma, jamais passará.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da ordem *Kinetoplastida* da família *Trypanosomatidae*. O impacto desta doença na sociedade é devastador, infectando milhares de pessoas anualmente. Sintomas como febre, anemia, hepatoesplenomegalia, úlceras cutâneas, além de mutilações, podem ocorrer. Como não existe um meio profilático seguro e eficaz, como uma vacina, as populações ficam expostas a doença. A terapêutica existente é prolongada e altamente tóxica. Por isso, vários pesquisadores vêm tentando criar uma vacina segura e eficaz contra a parasitose. Para se esclarecer e ressaltar a importância da atual situação das pesquisas relacionadas a vacina *anti-Leishmania*, foi realizado uma pesquisa por meio de levantamento bibliográfico, em artigos e periódicos. Foi realizado um estudo relacionando historicamente as principais pesquisas realizadas para obtenção da vacina. Esta pesquisa também tem o propósito de auxiliar as pessoas a conhecerem mais sobre a leishmaniose, os seus sintomas e tratamentos. Os dados obtidos mostram que a produção de uma vacina contra leishmaniose humana é ainda um grande desafio, porém as pesquisas comprovam que os estudos têm evoluído, e que uma nova e importante ferramenta, que é a biologia molecular, surgiu, com o desenvolvimento da vacina de DNA, podendo estar ai uma nova técnica de produção da vacina a tempos esperada.

Palavras-chave: Vacina anti-*Leishmania*; Leishmaniose; Vacinas

ABSTRACT

The leishmaniasis are caused by protozoa of the genus *Leishmania* order *Kinetoplastida Trypanosomatidae* family. The impact of this disease on society is devastating, infecting thousands of people annually. Symptoms such as fever, anemia, hepatosplenomegaly, skin ulcerations, and mutilation, may occur. As there is no means safe and effective prophylactic as a vaccine, people are exposed to disease. The existing treatment is prolonged and highly toxic. Therefore, many researchers have been trying to create a safe and effective vaccine against the disease. To clarify and emphasize the importance of the current status of research related to anti-*Leishmania* vaccine, was conducted a search through literature, articles and periodicals. We conducted a study related historically the main investigations carried out to obtain the vaccine. This research also aims to help people know more about the disease, its symptoms and treatments. The data obtained show that the production of a vaccine against human leishmaniasis is still a big challenge, but the research shows that studies have evolved, and that an important new tool, which is molecular biology, emerged with the development of vaccine DNA, there may be a new technique for production of the vaccine expected to time.

Keywords: Anti-*Leishmania* vaccine; Leishmaniasis; Vaccines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 2 - Forma mucocutânea.....	15
Figura 3 - Leishmaniose cutânea.....	16
Figura 4 - Forma Visceral.....	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	LEISHMANIOSE	12
2.1	Ciclo de Biológico	13
2.2	Aspectos Clínicos	15
2.3	Diagnostico e Tratamento	17
2.4	Aspectos Imunológicos	18
3	RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E MOLÉCULAS ENVOLVIDAS	20
3.1	Macrófagos	24
4	HISTÓRIA DAS VACINAS ANTI-LEISHMANIA	26
4.1	Vacinas de Primeira Geração, Segunda e Terceira	26
4.2	Vacinas de Parasitas atenuados ou Parasitas mortos	27
4.3	Adjuvantes	28
4.4	Vacina de DNA	29
4.5	Vacinas baseadas na saliva do vetor	31
	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da ordem *Kinetoplastida* da família *Trypanosomatidae*, é um importante problema de saúde mundial. Sua ocorrência se dá principalmente em países mais pobres como, por exemplo, Brasil, Bangladesh, Índia, Peru, Irã, Arábia Saudita, Síria e alguns países da África são os mais afetados. A leishmaniose é endêmica em 88 países. O vetor da leishmaniose é um flebotomíneo do gênero *Plebotomus spp* e acomete países do velho mundo e *Lutzomyia spp* que acomete os países da América. Têm-se como reservatório da doença, roedores, marsupiais e também acomete cães domésticos e o próprio homem, as principais formas da leishmaniose são: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucocutânea (PEIXOTO, 2009).

Diante desse contexto o primeiro capítulo desse texto descreve o ciclo biológico da leishmaniose, aspectos clínicos, diagnósticos, aspectos imunológicos e a terapêutica das leishmanioses que por sinal vem sendo a mesma por muitos anos e apresentam alta toxicidade. Mostra no decorrer do desenvolvimento da pesquisa que seu uso prolongado pode causar resistência do parasito, e como não há uma vacina efetiva e segura contra a doença resta apenas à prevenção individual, utilizando-se de mosquiteiros, repelentes e combate ao vetor. O primeiro capítulo conclui que este é um importante problema mundial e que a leishmaniose necessita urgente de uma vacina segura e eficaz.

Prosseguindo a pesquisa, em seu segundo capítulo o texto relata a relação parasito-hospedeiro e moléculas envolvidas na adesão e penetração nos macrófagos mostrando, o que os parasitas precisam para sua entrada na célula hospedeira ou para sobrevivência de algumas proteínas, que estão ancoradas na superfície do parasita como o glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo de grande importância na relação parasita-hospedeiro. Destaca ainda que a proteína mais importante é a GP63 (proteína majoritária da superfície da membrana do parasita) que se encontra em varias espécies de *Leishmania*, e tem um importante papel

como mediador no componente C3 do complemento. Mostra ainda este capítulo, que os macrófagos apresentam varias funções, como a replicação do parasita, célula apresentadora de antígenos (APCs) entre outras(SANTOS, 2009).

O terceiro capítulo traz em seu bojo a História das vacinas *anti-Leishmania*, que foram observadas ao longo do tempo . Conta a história que parasitas vivos foram utilizadas como meio de se adquirir imunidade contra a doença, essa prática já era usada por mães que expunham os braços de seus filhos a uma única picada do vetor da doença, acreditando-se numa possível proteção. Dessa forma, através desta técnica começaram a se extrair parasitas dos exsudatos de úlceras de pacientes ou animais infectados e proceder a uma inoculação em pacientes não infectados. Apesar de ser feito este procedimento em aplicação única em um local do corpo escondido, esta técnica se mostrou muito problemática, pois poderia tornar a doença mais grave ou gerar uma resistência parasitaria. Assim foi banido o uso de parasitas vivos como uma possível vacina. E começaram a utilização de parasitas mortos, não tendo um bom resultado nas primeiras pesquisas, porém foi gerado grande interesse pelos pesquisadores brasileiros(SANTOS, 2009).

Nota-se ainda neste capítulo que componentes da saliva do vetor também se mostraram interessantes para uma possível vacina, pela sua interferência na imunidade do hospedeiro na hora do repasso sanguíneo, embora tenha tornado importante a identificação destes componentes para um possível bloqueio, uma vez que algumas moléculas já foram identificados como, anti-coagulantes, de anti-agregação plaquetária e vasodilatadoras (TEIXEIRA *et.al.*, 2005). A associação do adjuvante com uma vacina contra a leishmaniose, tem se mostrado muito importante uma vez que é capaz de potencializar os antígenos fracos, reduzindo o custo da vacina e prolongando a duração da resposta imune (SANTOS, 2009).

Atualmente, pode-se afirmar que vários pesquisadores apostam no uso da vacina de DNA, sendo apontado como melhor candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose. Sabe-se que o parasito necessita de proteínas para sua sobrevivência ou para adesão do parasito à célula hospedeira. Sendo assim a primeira proteína a ser utilizada foi Gp63, por estar na superfície de várias espécies de *Leishmania*, e apresentar um importante papel como mediador no componente C3 do complemento (SANTOS, 2009). A vacina de DNA mostra vários resultados com números de proteção significativos sendo, portanto, considerada um dos melhores métodos para uma possível vacina contra a leishmaniose humana.

2 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença causada por várias espécies de protozoários, unicelulares digenéticos, do gênero *Leishmania*, que no hospedeiro vertebrado, é um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear. Seu impacto na sociedade é devastador, infectando milhares de pessoas anualmente (CASTRO, 2005).

A leishmaniose causa febre, anemia, hepatoesplenomegalia, ulcerações cutâneas, além de mutilações que eventualmente podem ocorrer. Como, atualmente, não se possui um meio profilático eficaz e seguro, como uma vacina, a população de áreas endêmicas usa os meios de proteção individual, que seriam o uso de repelentes, mosquiteiros, combate ao vetor, vacinação de cães domésticos e também evitar os desmatamentos. Uma vez que a terapêutica disponível apresenta alta toxicidade (hepatotóxico, nefrotóxico e cardiotoxico), tempo prolongado de tratamento e pode, ainda, causar a resistência do parasito ao medicamento disponível, se tornando um importante problema mundial, ocorrendo principalmente em países mais pobres do mundo como, Brasil, Bangladesh, Índia, Peru, Irã, Arábia Saudita e Síria além de alguns países da África, sendo considerada endêmica em 88 países, (REY, 2001). Como a leishmaniose é um importante problema de saúde mundial, uma vacina segura e eficaz seria o melhor meio de prevenção, e com isso toda população mundial seria beneficiada, diminuindo o número de casos e consequentemente a taxa de mortalidade.

O agente etiológico da leishmaniose se apresenta sob duas formas distintas, assim como nos revela Rey (2001, p.216):

Os agentes causais das leishmanioses são protozoários da ordem Kinetoplastida, família trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, caracterizam-se, este gênero, por apresentar apenas duas formas durante seu ciclo vital: a) Forma amastigota, quando é parasito intra celular em tecidos de hospedeiros vertebrados, b) Forma promastigota, quando se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (flebotomíneos), bem como em meios de culturas.

A forma promastigota é alongada, com flagelo bem desenvolvido medindo entre 16,0-40,0 μm , e sua reprodução acontece no trato digestivo do vetor; já as formas amastigotas parasito são arredondadas medindo cerca de 2-3,0 μm , sem flagelo livre e se multiplica no interior de macrófagos. A doença é dividida em cinco formas clínicas: visceral, cutânea, cutânea disseminada, cutânea difusa e mucocutânea (ALBUQUERQUE, 2006).

2.1 Ciclo Biológico:

O ciclo de vida do protozoário é heteróxico¹, apresentando dois hospedeiros diferentes: um vertebrado (alguns mamíferos como o cão doméstico, gambá, roedores silvestres, primatas dentre outros; um invertebrado que é inseto, denominado de flebotomíneo tanto do gênero *Plebotomus* spp e *Lutzomyia* spp, pertencentes a ordem *Diptera*, subfamília *Phlebotominae*, nas Américas o *Lutzomyia* é conhecido popularmente como tatuquira, birigui, mosquito-palha entre outros (REY, 2001).

Como se pode observar na figura 1, (A) o vetor adquire as formas amastigotas do parasita ao fazer o repasto sanguíneo em um reservatório do mesmo, como o cão, homem, marsupial, etc. (B) após a ingestão de sangue, dentro do intestino do vetor, as formas amastigotas se desenvolvem em formas alongadas, com flagelos, denominadas de promastigotas procíclicas, ocorrendo o processo de metaciclógênese, no qual as formas extracelulares, vão se replicar e se diferenciar em formas promastigotas metacíclicas, que não apresentam capacidade de se multiplicar, sendo considerada a forma infectante do parasito; (C) quando o vetor for fazer um novo repasto sanguíneo, inoculará, junto com a sua saliva, algumas formas de promastigotas metacíclicas. (D) após o vetor infectado injetar promastigotas, estas são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, células dendríticas), que dentro destas células se diferenciam de promastigotas para amastigotas. As formas amastigotas começam então a se reproduzir por divisão binária simples até aumentar o número de parasitos no macrófago parasitado, (E) ocorrerá então o rompimento do macrófago infectado e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outro macrófago. (FUMAGALLI, 2008).

¹ Heteróxico: Protozoário que tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros.

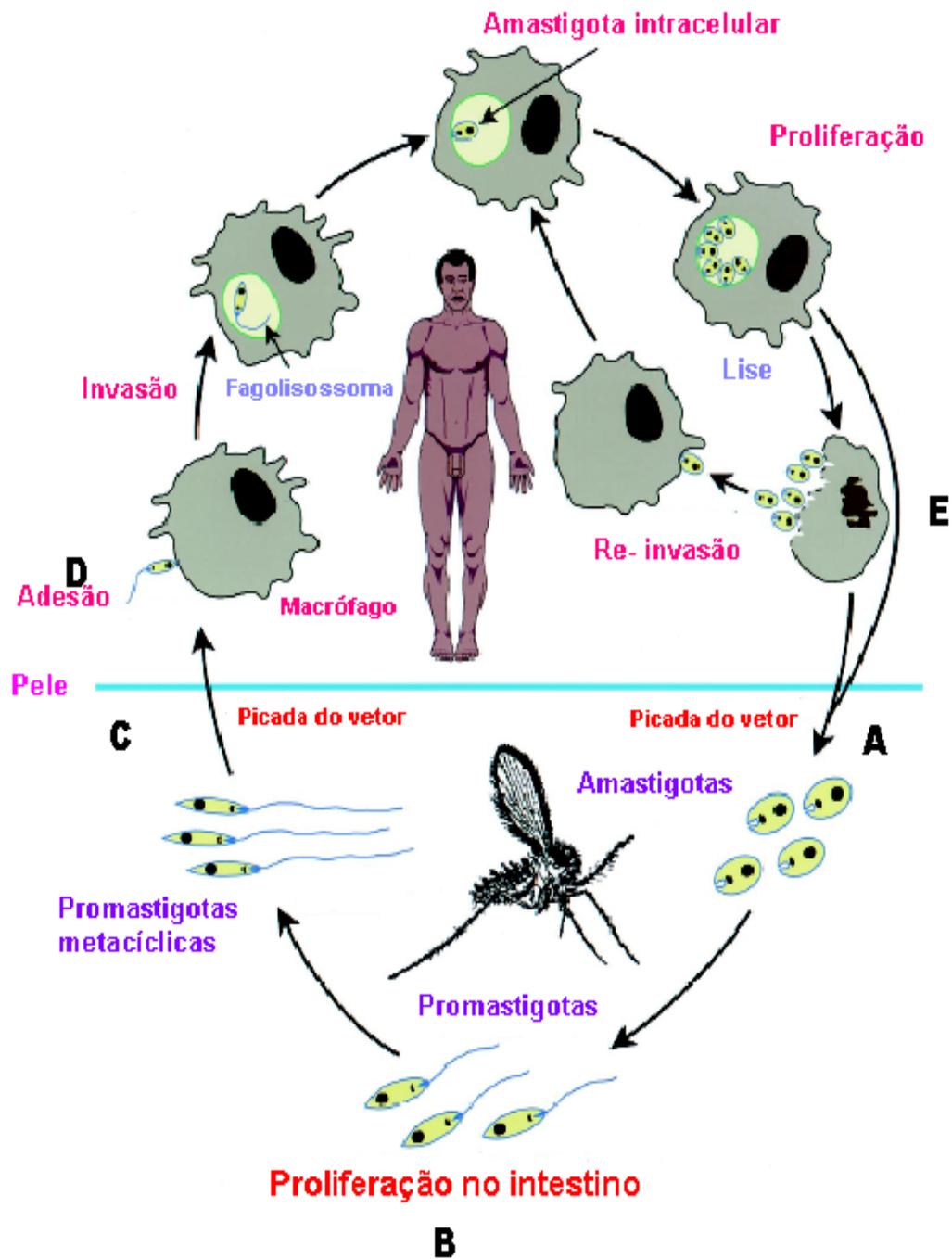


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*: descrição do ciclo no texto (A-E).

Fonte: http://195.45.99.81/izs/modules/news/article.php?com_mode=flat&com_order=1&storyid=2

2.2 Aspectos Clínicos

As leishmanioses são classificadas em duas formas: tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar é dividida em três formas clínicas, a forma cutânea que é caracterizada por ter uma única lesão sendo a mais comum, as espécies que provocam a doença são: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis*. A forma mucocutânea, é uma doença que pode evoluir para lesões desfigurantes se não tratada a tempo, as espécies que provocam a mucocutânea são: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* (FUMAGALLI, 2008).

A Leishmaniose mucocutânea no Brasil tem como agente etiológico a *L. braziliensis*. É uma doença de curso longo acometendo as mucosas e cartilagens, principalmente do nariz, boca, faringe e laringe e provocando nesses locais um processo ulcerativo. A doença se inicia pela asa do nariz passando para o palato mole até atingir a faringe e se não tratada a tempo essa doença provoca a perda do septo nasal (figura 2).



Figura 2. Forma mucocutânea: destruição da mucosa do nariz, e boca.
Fonte: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

A leishmaniose cutânea causa no seu hospedeiro vertebrado ulcerações podendo ser únicas ou múltiplas confinadas a derme com formato de uma cratera. Na ulceração inicial é encontrada um grande número de infiltrado de linfócitos, macrófagos e uma grande quantidade de parasitos, as espécies responsáveis pela

doença são: *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. amazonensis* (figura 3) (NEVES, 2005).



Figura 3. Leishmaniose cutânea: uma única lesão ulcerada de bordas elevadas como uma cratera.
Fonte: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

No Brasil a principal espécie que causa a leishmaniose visceral ou Calazar é a *L. chagasi*, e no resto do mundo a *L. donovani*, sendo uma doença de caráter crônica, grave e fatal para o homem se não tratada precocemente. É uma doença que acomete o fígado, baço, linfonodos e medula óssea, podendo provocar hepatomegalia, esplenomegalia, enfraquecimento do hospedeiro, perda de peso, anemia, palidez, dor abdominal e diarreia (figura 4) (GONTIJO E MELO, 2004). Desse modo podemos ver o problema social e psicológico que a leishmaniose pode causar, resultando em pessoas que são humilhadas e expulsas da sociedade, e o risco que milhares de pessoas correm todos os anos sem um meio profilático seguro e eficaz, como uma vacina.



Figura 4. Forma Visceral: também conhecida como Calazar.
Fonte: www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/

2.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico inicial das leishmanioses é baseado nos aspectos clínicos do paciente, podendo ser utilizadas técnicas de pesquisa direta e indireta associadas às lesões presentes na pele ou mucosa, alterações nas vísceras, e associação destes com dados epidemiológicos. O mais usado é a pesquisa direta do parasito em microscopia óptica, as formas amastigotas são colhidas da borda das lesões através de escarificações, biópsia, cortes histológicos, aspirados, cultura de tecidos infectados e inoculação em animais de laboratório (hamster e camundongo) (FUMAGALLI, 2008).

O diagnóstico pode ser realizado utilizando-se métodos com maior sensibilidade como, a reação em cadeia da polimerase (PCR) que vem se mostrando muito útil, por sua sensibilidade, porém, esse método não pode ser usado como teste de triagem de campo. Para identificar as espécies infectantes pode-se utilizar a técnica de eletroforese de enzimas e também de anticorpos monoclonais. Os testes sorológicos mais utilizados no Brasil são: teste imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação indireta e intradermorreação de Montenegro (FUMAGALLI, 2008).

O tratamento das leishmanioses tem se baseado no mesmo medicamento por mais de 60 anos, sendo utilizado os antimoniais pentavalentes que são medicamento de primeira escolha. Destes antimoniais os mais usados são Pentostan® (estibogliconato de sódio) e Glucantime® (antimoniato N-metil meglumina), porém estes medicamentos apresentam alta toxicidade (hepatotóxico, nefrotóxico e cardiotoxico) e seu uso prolongado pode ainda causar resistência do parasito, sua logística é sua administração muito difícil para o paciente que deve se submeter ao tratamento por vários dias consecutivos, onde muitos, inclusive, iniciam o tratamento e não terminam, acarretando resistência do parasito ao medicamento (GONTIJO E MELO, 2004).

Como a terapêutica da doença é tóxica, prolongada, de alto custo e causando vários efeitos colaterais, o uso de medidas profiláticas eficientes como uma vacina segura e eficaz, seria a melhor opção para a prevenção da doença. E como dito anteriormente, a população de áreas endêmicas não ficaria exposta, e dependente de meios profiláticos não tão seguros. Nessa perspectiva, ressalta-se a importância de estudos e pesquisas que visem uma vacina segura e eficaz contra a leishmaniose humana.

2.4 Aspectos Imunológicos

Muitos estudos relacionados à imunidade das leishmanioses são realizados na tentativa de identificar fatores responsáveis pelos fenótipos de resistência e susceptibilidade a infecção pelo parasita *Leishmania*. (FUMAGALLI, 2008).

Já se foram vários anos de pesquisas para compreender a resposta imune das leishmanioses, e pouco ainda se sabe, não sendo muito bem compreendido, o sistema imune do homem produz uma resposta celular e humoral contra a *Leishmania*, e são caracterizados por dois padrões de resposta, Th1 e Th2, estes padrões foram desenvolvidos em estudos com modelos murinos, tanto o Th1 quanto o Th2 são padrões idênticos aos do homem. Os antígenos são apresentados aos linfócitos T CD4+, pelos macrófagos na modulação da resposta imune, que são subdivididos em: Th1 e Th2, as citocinas pré inflamatórias (IL2, INF- γ , IL12 e TNF- α) são citocinas específicas que foram diferenciadas pela resposta de resistência do hospedeiro as células efectoras T *helper* CD4+. Acredita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção pelo parasito está relacionada com o nível

de expansão dos clones de células Th1 e Th2. Já a resposta de células Th2 está relacionada a suscetibilidade á infecção, e são secretadas citocinas específicas como a IL-4, IL5, IL6, IL10, TGF- β . Como os mecanismos de CD4+ que levam a infecção, não estão totalmente esclarecidos, algumas evidências sugerem que a infecção por *Leishmania* pode ser afetada pela presença de determinadas citocinas ou pela influência de outros sinais co-estimuladores e mecanismos sinalizadores diferenciais usados pelas subclasses de células TH e sua utilização com os receptores (NEVES, 2005).

A presença de respostas TH polarizada tem sido relatada em várias infecções humanas. Em diferentes formas clínicas foram constatadas variação do padrão de resposta, resultando na existência de formas polares da doença tal como na hanseníase. Na forma cutânea localizada, observa-se uma correção com a resposta do tipo Th1, sendo um processo granulomatoso tipo tuberculóide, com alta carga linfocitária e plasmocitária, marcada por ausência ou escassez de parasitos, mas ocorrendo o contrário nas formas progressivas, nas quais a doença progride, podendo evoluir para a forma cutaneomucosa, apresentando expressão simultânea de citocinas Th1 e Th2, ou seja, um padrão Th0. A leishmaniose cutâneo-difusa está correlacionada com a resposta do tipo Th2, em que há infiltração dérmica de macrófagos, vacuolizados, repletos de amastigotas e com escassez de linfócitos, em humanos caracteriza um padrão de suscetibilidade (NEVES, 2005).

A resposta imune de portadores de leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode ser demonstrado por testes *in vivo*, como o Teste de intradermorreação de Montenegro, e pelo teste de proliferação linfocitária *in vitro*. A resposta celular é variável conforme o quadro clínico dos pacientes acometidos pela forma cutânea, e usualmente suprimida nos casos de leishmaniose difusa. Em pacientes portadores da LTA após anos de tratamento é comum observar resposta imune celular contra antígenos de *Leishmania*. Em todas as manifestações clínicas de LTA, a resposta imune humoral está normalmente presente, já na leishmaniose difusa foi observado um alto nível de anticorpos, e na leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa, os níveis de anticorpos são baixos ou um pouco elevados, quando ocorre o acometimento de mucosa. Nas formas clínicas cutânea e cutaneomucosa foi observado uma alto nível de anticorpos IgG1 e IgG3, e na forma cutâneo difusa teve um aumento nos níveis de IgG4 e IgG1 (NEVES, 2005).

3 RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E MOLÉCULAS ENVOLVIDAS

Leishmania são parasitos intracelulares do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos, e sua infecção envolve uma série de elementos macrofágicos que são estimulados a crescer de modo extraordinário. A relação parasito-hospedeiro tanto na cura, quanto na produção de formas clínicas, são as mais diversas e depende de fatores genéticos do parasito e do hospedeiro, e também da interação entre parasitos e células hospedeiras (macrófagos) e de outras células imunocompetentes envolvidas na estimulação ou na modulação das reações imunológicas principalmente os linfócitos T e B. A infecção por *Leishmania*, vai induzir respostas imunitárias que são tanto do tipo humoral, que se destacam pela produção de anticorpos, e do tipo celular que provoca uma hipersensibilidade de tipo retardado, porém o grau em que ocorre essas respostas varia muito com as diversas formas da doença (REY, 2009).

Tem sido observado que a saliva do vetor apresenta várias moléculas, que interferem na imunidade do hospedeiro no ato do repasto sanguíneo. A identificação destes componentes é muito importante, para um possível bloqueio dessas moléculas, que já se sabe apresentam ações anti-coagulante, anti-agregação plaquetária e vasodilatadora, sendo dessa forma que o vetor consegue controlar a hemostasia do hospedeiro e realizar o repasto sanguíneo tranquilamente (TEIXEIRA *et.al.*, 2005).

Uma das moléculas caracterizadas como hialuronidase, tem um importante auxílio na difusão de outros componentes como prostaglandina E2 (PGE2), a apirase e prostaciclina, promovendo a dilatação sanguínea e impedindo a agregação plaquetária. Das substâncias vaso dilatadoras o Maxadilan, é caracterizado como um potente vaso dilatador, só encontrado na saliva de *L. longipalpis*, promovendo a formação de um lago sanguíneo, melhorando o repasto sanguíneo dos flebotomos (TEIXEIRA *et.al.*, 2005).

A estratégia de invasão do parasito na célula hospedeira, e sua sobrevivência através de algumas proteínas contidas na superfície do parasito, são de extrema importância. Todos os tripanosomatídeos apresentam em sua superfície celular proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), formando assim uma cobertura que protege a superfície do parasita e medeia interações entre hospedeiro-parasita. Acredita-se que a associação das proteínas ancoradas na superfície do parasita, por GPI formem *clusters* em microdomínios das membranas celulares, mais conhecidos como *lipids rafts*, em associação com colesterol, glicosfingolipídios, esfingomiélinas entre outras proteínas sinalizadoras (SANTOS, 2009).

Estas proteínas no parasito formam uma barreira de difusão macromolecular, protegendo as promastigotas dos processos microbicidas, como lise mediada pelo sistema complemento, e radicais de oxigênio. As proteínas GP63, GP42 são denominadas de proteofosfoglicanas (PPG) sendo um complexo lipofosfoglicano(LPG) e são algumas das proteínas ancoradas por GPI na superfície das promastigotas. Na forma amastigota da *Leishmania* são cobertas por um pouco de glicocálix sendo sua maioria composto por GIPLs e glicolipídeos que são derivados da célula hospedeira (SANTOS, 2009).

A proteína majoritária da superfície da *Leishmania* é a GP63 com peso molecular de 63 KDa, essa proteína está presente na superfície de várias espécies de *Leishmania*. Está presente tanto na forma promastigota quanto na amastigota de *L. major* e *L. mexicana*, sendo que cada promastigota tem aproximadamente 1% da proteína GP63. Esta proteína tem um importante papel como mediador no componente C3 do complemento (C3b e C3bi) intermediando a ligação da forma promastigota ao macrófago, e ainda promovendo proteção contra a degradação dentro do fagolisossomo do macrófago, exibindo uma ótima atividade em ambiente ácido do fagolisossomo, degradando as enzimas lisossomais que estão neste ambiente. Outras proteínas têm mostrado uma participação na resposta imune, por exemplo, as PPGs, GP42, GP46/M2. Ainda conforme Santos (2009).

O lipofosfoglicano (LPG) não é um composto protéico, mas tem um importante papel na interação do parasita com o hospedeiro, sendo o mais abundante glicolipídeo na superfície das promastigotas, formando um glicocálix em toda superfície do parasita. Apresenta importante participação no complemento, e ainda interage com outras proteínas do soro promovendo a entrada dos parasitas

nos macrófagos, também podendo contribuir com resistência contra os efeitos microbicidas dos macrófagos, por exemplo, inibindo a proteína C quinase, interferindo na produção de óxido nítrico (NO) e inibindo a maturação do fagossomos (FUMAGALLI, 2008).

Quando o vetor injeta na derme de um hospedeiro (vertebrado) as formas promastigotas da *Leishmania*, ocorre o desencadeamento de uma resposta com fatores séricos e inflamatórios. Na tentativa de remover os parasitas, pelo sistema do complemento, tanto na via clássica e alternativa, nem todos os parasitas são mortos, e aqueles sobreviventes vão conseguir penetrar nos macrófagos pelos receptores C3 e via CR3, se transformando em amastigotas, após a formação do complexo de ataque a membrana C5b-C9e e conseqüente lise, de forma que vai resultar na morte aproximadamente 90% dos parasitos inoculados. Com a falta de ativação celular dentro do macrófago, pela inibição da liberação de IL-12, essa falta de ativação celular faz com que o parasita se multiplique. As células NK chegam ao local da infecção nas primeiras 24 horas, com ação citotóxica, e também são fontes primárias de INF- γ , ajudando numa resposta imune protetora (PEIXOTO, 2009).

A relação do hospedeiro não-imune, quando, por exemplo, a *L. tropica* é introduzida na pele de um homem pela primeira vez, o parasitismo induz o aumento histiocitário e a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos, o que aparentemente não consegue destruir todos os parasitos, assim ocorrendo a multiplicação do protozoário (forma amastigota) nos fagossomos dessas células (REY, 2009).

O aumento dos histiócitos e o crescimento do número das amastigotas, continua até que ocorra no local uma infiltração de linfócitos e plasmócitos. Após a apresentação desses elementos, repara-se uma diminuição da proliferação dos macrófagos e com isso uma diminuição, por haver um baixo número de parasitos a tal ponto que, após certo tempo, só poderá comprovar a doença mediante semeadura do material de biópsia ou punção, realizando um meio de cultura conveniente. Após certo tempo o parasito vai desaparecer (com isso as culturas serão negativas) regredindo as reações inflamatórias e começando um processo de reparação (REY, 2009).

Este esquema da evolução da lesão de leishmaniose cutânea no homem pode apresentar algumas variantes, podendo sofrer necrose na epiderme e nas camadas subjacentes, ocorrendo à forma ulcerosa, que algumas vezes é

complicada por infecções bacterianas secundárias, com isso a cura tem que envolver mecanismos de reparação e cicatrização, alterando a estrutura histológica primitiva. A duração da proliferação histiocitária e a infiltração linfoplasmocitária vão variar de individuo para individuo, nos quais sem nenhuma forma de tratamento a cura espontânea, pode ocorrer entre 3 a 18 meses. Se o hospedeiro for infectado novamente pela mesma espécie de *Leishmania*, antes de completar o processo evolutivo da lesão, vai acontecer uma super infecção, que não vai repetir toda a evolução, começando pelo nível do processo histopatológico que foi alçando pela primeira lesão (REY, 2009).

Já no hospedeiro com imunidade, por exemplo, quando um indivíduo imune é infectado por *L. tropica*, não são destruídos todos os parasitos imediatamente, uma experiência realizada nestas condições, foi observado o parasito através de meio de cultura, a partir do material da lesão, depois de 24 horas da inoculação, mas não conseguindo uma cultura positiva depois de 48 horas. Existem alguns relatos de que a uta, causada pela *L. peruviana* e seus aspectos clínicos, são muito parecidos com a leishmaniose cutânea, e a sua epidemiologia sugere que a cura da doença é seguida de uma forte imunidade, de tal forma que as populações endêmicas dessa região só são infectados pela doença uma vez. Portanto nas experiências realizadas com *L. tropica*, foi verificado em uma minoria de indivíduos que a imunidade através da cura espontânea, não foi totalmente eficiente (REY, 2009).

O processo lembra o lúpus vulgaris, com um alto nível de infiltração linfoplasmocitária, com presença de gigantócitos ocasionais, e uma baixo numero de parasitos com uma reação inflamatória exagerada e grave, como neste caso as reações celulares são também um mecanismo de defesa, mas não consegue destruir totalmente os parasitos. Reduzindo a um menor numero considerável, e permitindo que a reação celular se mantenha (REY, 2009).

As primeiras células presentes no local da infecção ou da lesão tecidual são os polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), funcionando como células efectoras e fagocitárias primarias, mas as formas das promastigotas liberam um fator muito potente contra neutrófilos, o LCF (*Leishmania* Chemotatic Fator), mas não afetando outros leucócitos, como monócitos, células NK (natural killer). Qualquer fragmento estranho ingerido é destruído por enzimas proteolíticas contidas nos grânulos citoplasmáticos, e pela produção de radicais de oxigênio, ocorrendo após, uma produção de neutrofílica de interleucina-8 (IL) provocando um aumento de mais

neutrófilos para o local da infecção. O mecanismo de parasitismo é benéfico para a *Leishmania*, direcionando o processo inflamatório a uma resposta imune inespecífica, conseguindo escapar da ação das células efetoras, como os macrófagos e com isso o parasita permanece no tecido (PEIXOTO, 2009).

Na circulação sanguínea os PMNs têm uma vida curta de 6 a 10 horas, onde vão sofrer apoptose, o atraso ocasionado pela leishmaniose de 2 a 3 dias não previne a apoptose dos neutrófilos infectados, os PMNs são divididos em células CD28+ ou CD28-, e os primeiros tem a capacidade de interagir com CD80/86 dos macrófagos, induzindo uma produção de INF- γ e fatores quimiotáticos de células T, assim começando o estímulo inicial imune de células T para combater a leishmaniose. Após dois a três dias vai ocorrer uma entrada de monócitos e macrófagos no local do processo inflamatório, proporcionado pela produção de quimiocinas indutoras (*macrophage inflammatory protein-1alfa* MIP-1 α e MIP- β). Os macrófagos fagocitam os PMNs infectados pela identificação de fosfatil contida na superfície das células inflamatórias, dessa forma não ocorre a ativação das funções antimicrobianas dos macrófagos, sendo o melhor caminho de invasão do parasito na célula hospedeira (PEIXOTO, 2009).

3.1 Macrófagos

Os macrófagos apresentam varias funções, permitindo a replicação do parasito, por outro lado funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs) e fonte de citocinas que modulam a resposta imune mediada pelas células T. As moléculas de LPG e gp63 são as principais moléculas de superfície da *Leishmania*, essas moléculas em contato com C3b e C3bi do sistema complemento, vão interagir com CR1 e CR3 da superfície dos macrófagos, com isso é permitido a entrada do parasito no macrófago. Os receptores: CR4, receptor fibronectina, receptor Fc de gama imunoglobulina, receptor manose-fucose (MFR) e receptor da galectina-3, também estão envolvidos na interação parasitos e macrófagos (PEIXOTO, 2009).

Quando são ativados os macrófagos, principalmente por lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) ou TNF- α , vão apresentar no interior de seus fagolissomos secundários, além de enzimas hidrolíticas uma serie de metabolitos

tóxicos do oxigênio (ânion óxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) na tentativa de eliminar os parasitas *Leishmania* (ALBUQUERQUE, 2006).

Para que ocorra a produção destes metabolitos tóxicos, ocorrerá um grande consumo de oxigênio pelos macrófagos conhecido como (burst) respiratório ou explosão respiratória. Estes fagócitos conseguem sintetizar óxido nítrico a partir de L-arginina pela enzima NO-sintetase induzida (iNOS), que é importante radical livre microbicida, que reage com o superóxido gerando peroxinitrito, outro agente citotóxico (ALBUQUERQUE, 2006).

Os macrófagos ativados começam produzir diferentes tipos de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-18, IL-12, IL-6 e INF- γ . Na maioria das infecções parasitárias intracelulares o IL-12 é um bom adjuvante, e um pré-requisito a resposta imune de TH1, os macrófagos e DCs são responsáveis pela sua produção (PEIXOTO, 2009).

Quando ocorre uma interação do CD40 com o CD40L na superfície dos macrófagos, com o CD40L da superfície dos linfócitos T ativados, a produção e expressão de IL-12, ativando células T a produzirem INF- γ . Apesar de que o macrófago tenha o mecanismo de proteger o hospedeiro de parasitos intracelulares, mas eles possuem mecanismos adaptativos que modulam a resposta inflamatória como forma de persistência no tecido (PEIXOTO, 2009).

4 HISTÓRIA DAS VACINAS ANTI-LEISHMANIA

Historicamente a vacinação contra a leishmaniose humana é conhecida e praticada desde a antiguidade onde se acreditava que indivíduos com lesões cicatrizadas na sua pele eram imunes a uma nova infecção por *Leishmania*. Alder em da universidade Hebrew de Jerusalém foi o primeiro a desenvolver a vacina, ao observar que as mães libanesas expunham seus bebês a picadas de flebotomíneos. Quando percebiam que havia tido uma única lesão, que se auto curava poderia proteger seus filhos da forma mais severa da doença (SANTOS, 2009).

Outro método usando antigamente no oriente médio, era a retirada de material escarificado de uma ferida de um indivíduo infectado, é aplicado em uma pessoa não infectada, acreditando que essa técnica iria trazer proteção contra a doença. O local de aplicação era em partes do corpo onde a cicatriz ficaria escondida. Essa prática era conhecida como leishmanização e foi usada na década de 70 e 80 em Israel e Ira, porém como essa técnica utilizava parasitos vivos e virulentos recuperados dos exsudatos, mais tarde foram substituídos por parasitas cultivados em meio livre de células, por outro lado foi banida a técnica por trabalhar com parasitas vivos, com a possibilidade de uma persistência do parasita no hospedeiro imune agravando a doença (SANTOS, 2009).

4.1 Vacinas de Primeira Geração, Segunda e Terceira

A primeira tentativa de vacinação com parasitas vivos foi realizado na união soviética, obtendo-se cerca de 80% de infecções imunizantes, e no mesmo período começou-se a trabalhar com promastigotas vivas em Israel, onde foram inoculadas 167 pessoas, mais tarde foi realizado um novo estudo onde foi inoculado um grupo de 555 pessoas, notando-se que não ocorreram efeitos colaterais e recomendação do autor para utilização também em crianças, iniciando a vacinação em grande escala. Na vacinação homologa era utilizado um parasito da mesma espécie que se queria proteção, mais foi relatado que a principal consequência era a possibilidade

de desenvolvimento de formas mais graves da doença, então podendo ser utilizados só parasitos reconhecidamente causadores de formas autolimitadas da doença. Com isso nenhuma das espécies que provocam a doença nas Américas poderia ser classificada. Em 1963, Lainson e Strangways-Dixon, tentaram a proteção contra a infecção por *L. mexicana*, usando um número menor de parasitas da mesma espécie e inoculados em local diferente da orelha. A aplicação da vacinação era sempre feita em um local não exposto do corpo (NETTO, BARRAL, 1987).

O uso dessa técnica foi criticado devido ao risco de apresentar problemas como, múltiplas lesões agravando a situação e até podendo igualar a um caso de infecção natural. Além disso, foram registradas infecções secundárias nas úlceras da vacina, chegando a 25% da população vacinada e algumas reações alérgicas em pacientes que fora imunizados. Já na infecção heteróloga constituída por parasitas não virulentos ou virulentos. Era composta por parasitas de uma espécie diferente daquela que se queria propor imunidade. Há relatos que um macaco que tinha sido infectado pela *L. tropica* se tornou resistente a infecção por *L. Donovanii* e mais tarde o fato foi confirmado em cães (NETTO, BARRAL, 1987).

Como a utilização de organismos vivos como vacina ocorreram muitos problemas, por exemplo, formação de graves lesões de pele não controladas, alergias, outras afecções de pele e imunossupressão. O uso de promastigotas vivas virulentas como meio de vacina foi interrompido.

4.2 Vacinas de Parasitas atenuados ou Parasitas mortos

A idéia de uma vacina composta por parasitas atenuados ou principalmente produtos parasitários, era para se evitar os perigos existentes encontrados anteriormente no emprego de parasitas infectantes, tanto virulentos ou não e homólogos ou heterólogos. Foi realizado um experimento por Parrot em 1929, na tentativa de conseguir imunidade em macacos usando *Leishmania* morta pelo calor, e utilização de parasitas que perderam sua infectividade devido a longa manutenção em cultura, esse experimento foi realizado em camundongos, não sendo bem sucedido em nenhuma das tentativas. Salles-Gomes em 1939 tentaram tal imunização e depois em 1940 o Prof. Samuel Pessoa, Com isso houve um interesse de pesquisadores brasileiros de produzir uma vacina com parasitas mortos (NETTO, BARRAL, 1987).

Um estudo mais recente sobre radiação ionizante nas formas metacíclicas do parasita da espécie *Leishmania amazonensis* como forma de seleção para uma resposta imune. Foram comparados diferentes grupos de camundongos imunizados com esses parasitos, observando-se que apenas os camundongos Balb/c que foram imunizados com parasitas selecionados com as doses de radiação (100 e 400 Gy), apresentaram títulos de anticorpos significativos ($p < 0.001$). Por outro lado, os camundongos C57/bl6 que foram imunizados com parasitas selecionados com a dose de 400 Gy, apresentaram níveis intermediários de anticorpos ($p < 0.05$), mantendo-os após 45 dias do desafio (BONETTI, 2006).

Outros testes foram realizados para saber qual o tipo de subclasses de Imunoglobulina G estava envolvida. Os camundongos Balb/c apresentaram após 15 dias da última dose de imunização um aumento da subclasse IgG1. E também os níveis de IgG2 também apresentaram-se elevados. Já os camundongos C57/bl6 apresentaram uma diminuição dos títulos de IgG1 nos primeiros 15 dias após a última dose. Foi relatado que no grupo controle os camundongos receberam doses de parasitas mortos com elevada dose de radiação, sem seleção com doses mais baixas. Ao final do experimento, os níveis de IgG1 se mostraram baixos, porém com os níveis de IgG 2b aumentados (BONETTI, 2006).

4.3 Adjuvantes

Muitos pesquisadores acreditam na associação de adjuvante na vacina contra a leishmaniose. Assim recentemente vários pesquisadores tentaram identificar novos adjuvantes como o ONO-4007, um adjuvante que vai aumentar a imunidade do tipo 1 e induzir produção de óxido nítrico, podendo apresentar efeito leishmanicida. Esta associação foi testada contra *L. Amazonensis* e *L. Major*, obtendo-se um bom resultado com inibição da proliferação do parasita na célula hospedeira. O autor relata ainda que os adjuvantes melhoram as vacinas de várias formas, potencializando antígenos fracos, reduzindo a dose de antígenos na vacina assim reduzindo o custo, elevando a duração da resposta imune, modulando a avidéz do anticorpo. Apesar de tudo ainda não se conhece totalmente o mecanismo de ação da maioria dos adjuvantes (SANTOS, 2009).

Outra pesquisa relata a utilização do UFV H2b20, como adjuvante na tentativa de imunizar camundongos BALB/c contra a *Leishmania braziliensis*. Apesar de *in*

vitro esse *Lactobacillus* induzir altos níveis de resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- λ , TNF- α e IL-12., não se mostrou capaz de proteger camundongos BALB/c. Não atendendo ao propósito como adjuvante indutor de uma resposta protetora especificamente para esse tipo de parasita (CASTRO, 2005).

Outros estudos nos mostraram o potencial da BCG na vacinação contra leishmaniose. O *M. Bovis* de BCG é usado como adjuvante em algumas vacinas formuladas com parasitas mortos. A associação BCG com composto de *L. amazonensis* e *L. Mexicana* no Equador, foi capaz de induzir 73% de proteção, mais tarde foram feitos novos estudos para a confirmação destes resultados, que foram considerados inconclusivos (NASCIMENTO *et.al.*, 2009).

Estudos realizados com uma molécula hsp70 (proteína de choque térmico) usada como adjuvante para melhorar a resposta das células T, possuindo funções de citocinas mostrou que a função apresentadora de antígeno foi melhorada (SACHDEVA *et.al*, 2009).

4.4 Vacina de DNA

Atualmente, vários pesquisadores apostam no uso da vacina de DNA, tendo como melhor candidato para o desenvolvimento de vacina contra a leishmaniose as proteínas que o parasito necessita para sua sobrevivência ou a adesão de um parasito para célula hospedeira O primeiro candidato para vacina de DNA foi a proteína Gp63, por estar na superfície de varias espécies de *Leishmania*, sendo glicoproteína de 63 kDa. Num estudo realizado com a proteína gp63 associada com proteínas de choque térmico de 70 kilodalton (Hsp70) molécula adjuvante, foi relatada uma redução significativa da carga parasitaria depois de 30 dias da infecção em camundongos BALB/c. Foi observado que a proteína gp63 recombinante potencializou a capacidade imunogênica do antígeno DNA gp63 vacina, ocorrendo aumento de citocinas de perfil Th1. Ambas as vacinas demonstraram contra a infecção parasitária uma grande eficiência, reduzindo a carga parasitária em camundongos BALB/c. Por outro lado, a proteína impulso não aumentou significativamente a eficácia das vacinas testadas. Mais quando foi comparado todas as vacinas, a Poly tope DNA vacina associada com o adjuvante Hsp70 mostrou uma maior eficiência (SACHDEVA *et.al*, 2009).

Em outra pesquisa foram isoladas 11 proteínas de *L. Amazonensis*, com pesos moleculares variando de 13.5 a 97 Kda, e essas proteínas foram combinadas com BCG e gp63, sendo observado uma proteção de 42,86% nas vacinas constituídas de gp63+46+22kDa, gp63+13.5+25+42kDa, gp63+46+42kDa, gp63+66kDa e gp63+97kDa, e 57,14% na proteção obtida com a vacina gp63+46+97kDa, gp63+46+97+13.5kDa, gp63+46+33kDa, e 71,43% com uma vacina contendo todas as proteínas é gp63, e foi mostrado que a proteína de 40kDa, não apresentou uma boa proteção contra a leishmaniose cutânea sendo assim excluída dos estudos (MORA et. al, 1999).

Foram avaliados 10 PUFs, que são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro infectado com *Leishmania infantum*, observado que os rLiPUF1 e rLiPUF2 teve uma forte reatividade, e os rLiPUF4, rLiPUF5 e rLiPUF8, tiveram teores regulares, enquanto rLiPUF3, rLiPUF6, rLiPUF7, rLiPUF9b e rLiPUF10 tiveram baixa reatividade. Como os PUFs são reconhecidos no soro de hospedeiros pelo sistema imune, podendo ter utilidade no desenvolvimento de uma vacina ou no diagnostico da leishmaniose (FOLGUEIRA et. al, 2010).

No seguinte trabalho, com uma proteína ribossomal PO (LiPO), foi observado uma resposta humoral Th2 predominante. Foi administrado proteína recombinante solúvel, tanto do tipo proteína (rLiP0) ou em um formato de DNA plasmidial (pcDNA3-LiP0). Nos camundongos inoculados com plasmídeos pcDNA3 LiP0 houve uma ausência de anticorpos contra o LiPO proteína no soro, com isso foi realizado um grupo adicional de camundongos que foram vacinados tanto com pcDNA3-LiP0 e estimulados com rLiP0, os camundongos desenvolveram altos níveis de anticorpos anti-LiPO do que aqueles que foram vacinados apenas com proteínas solúveis. Foi demonstrado que houve uma redução parasitária na utilização da vacina de DNA LiPO, e encontrado uma resposta de anticorpos IgG2a inicial contra LiP0 que mudou para um perfil misto-IgG1 IgG2a. Mais foi observado que a resposta imune não foi suficiente para impedir a progressão da infecção de uma alta dose de cepa virulenta. Outros estudos mostram um grande potencial para uma futura vacina contra leishmaniose na formulação de DNA (IBORRA et al, 2003).

Em um estudo envolvendo lipossomas e antígeno da membrana do parasita da *Leishmania donovani*, induziu a produção de anticorpos específicos, e uma resistência contra a infecção por *Leishmania donovani* (BATISTA et. al, 2007).

O estudo feito com proteínas de ribossomos combinadas com CpG Oligodeoxynucleotides, foi capaz de controlar uma segunda infecção, reduzindo consideravelmente o número de parasitas em camundongos desafiados com *Leishmania major*, observando-se um nível predominante de resposta Th1 contra os antígenos do parasita, e altos níveis de IFN- γ específico do parasita. Os camundongos apresentaram uma alta relação IgG2a/IgG1 para detecção de anticorpos *anti-Leishmania* (RAMIREZ et al, 2009).

4.5 Vacinas baseadas na saliva do vetor

As substâncias existentes na saliva dos flebotomíneos apresentam uma grande atividade imunogênica e aumentam a produção de anticorpos contra várias proteínas. Não está totalmente esclarecido o exato papel destes anticorpos na proteção contra leishmaniose. Alguns estudos em animais mostraram que quando expostos a picadas de flebotomíneos ou inoculados com o SGS, eles desenvolvem elevados níveis de anticorpos IgG anti-saliva (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Em outro trabalho foi observado que grupos de animais vacinados com a proteína MAX da saliva do vetor, apresentaram redução de três a cinco vezes no tamanho das lesões em relação aos animais não vacinados, redução do crescimento parasitário, e a cicatrização ocorreu em 50 dias após a infecção, enquanto no grupo tratado com adjuvante ou diluente, após 65 dias ainda não tinha ocorrido a cicatrização (AIRES et al, 2005).

Foi isolado um grande número de proteínas salivares e genes do vetor *Phlebotomus papatasi* e foi encontrado uma proteína de 15 kDa, denominada PsSP115. Tornando resistentes a uma infecção constituída de saliva mais parasitas, os animais imunizados com a sequência SP15 associado com proteína ou plasmídeo, apresentaram uma intensa reação de hipersensibilidade tardia (RHT) e um aumento na produção de anticorpos, uma construção de cDNAs provenientes da glândula salivar de *L. longipalpis*, proporciono uma resposta imune celular contra antígenos da glândula de *L. longipalpis* em camundongos e BALB/c. E outras construções de cDNA protegeram animais infectados com *L. chagasi* mais SGS de *L. longipalpis*. Além de uma proteção foram capazes de induzir uma reação de RHT, os estudos relacionados a saliva do vetor nos mostra novos candidatos para uma vacina segura e eficaz contra a leishmaniose, e associada a técnica de DNA, poderá

ser uma grande alternativa para induzir uma resposta imune contra os produtos da saliva, assim impedindo a transmissão da leishmaniose (TEIXEIRA *et.al.*, 2005).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho revela que a leishmaniose é uma zoonose em franca expansão no Brasil, sendo considerada uma das cinco doenças cujo estudo foi considerado prioritário pela OMS. Além de causar milhares de óbitos anuais é capaz de induzir deformidades extensas que afastam o indivíduo do convívio social, apresentando sintomas como febre, anemia, hepatoesplenomegalia e ulcerações cutâneas. Como a terapêutica disponível para a parasitose apresenta alta toxicidade (hepatotóxico, nefrotóxico e cardiotoxico), tempo prolongado de tratamento e pode causar a resistência do parasito, seria o ideal a utilização de um bom método profilático, como uma vacina efetiva contra a doença. Como até o momento uma vacina eficaz contra o parasito não foi desenvolvida, a prevenção individual, utilizando-se de medidas como: uso de mosquiteiros, repelentes, combate ao vetor (inseticidas), etc., (o que não tem grande efetividade em áreas endêmicas), tem sido utilizada.

As pesquisas, no sentido de se produzir uma vacina eficiente, iniciaram-se a muitos anos, com pesquisadores observando praticas populares como, por exemplo, expor seus filhos a picada do vetor para uma possível imunidade. Com isso veio a primeira técnica de vacinação contra parasitose, parasitas vivos foram retirados de exsudatos de feridas e reaplicados em pacientes esperando-se que este se tornasse imune ao parasita. Depois de um tempo foi melhorada a técnica e se utilizava parasitas cultivados *in vitro*. Essa técnica era conhecida como leishmanização teve bons resultados no inicio, mas com o passar do tempo foi observado que algumas pessoas imunizadas, com esse técnica apresentaram a doença e ainda que pudesse ocorrer a forma mais grave da doença. A partir de então foi constatado que seria arriscado trabalhar com organismos vivos, sendo assim banida a técnica (SANTOS, 2009).

Porém, os esforços não pararam, e começaram as pesquisas utilizando-se de parasitas mortos ou fragmentados. Parrot (1929) usou *Leishmania* morta pelo calor, e observou que os parasitas perdiam sua infectividade. Salles-Gomes (1939) e

Samuel Pessoa (1940) tentaram repetir tal experimento, porém, não obtiveram sucesso (NETTO E BARRAL, 1987).

Apesar destas tentativas não terem dado certo, vários pesquisadores acreditaram no potencial de uma associação de parasitos com um adjuvante para uma melhor eficácia da vacina. Outras substâncias também são pesquisadas pela sua importância como a saliva dos flebotômíneos que mostraram uma grande importância, por apresentarem uma grande atividade imunogênica aumentando a produção de anticorpos contra várias proteínas podendo ser um possível candidato a vacina.

A ferramenta mais recente utilizada no desenvolvimento da vacina anti-*Leishmania*, é o DNA. Esta técnica aborda dois caminhos, a inibição da entrada do parasita na célula hospedeira e o bloqueio das proteínas que o parasita necessita para sobreviver. Pesquisas demonstraram que a imunidade ao parasita aumentava surpreendentemente quando se utilizava tal vacina, demonstrando o grande potencial da mesma.

Esse trabalho nos mostra que a produção de uma vacina anti-*Leishmania* tem sido um grande desafio há décadas. As pesquisas comprovam que os estudos têm evoluído e com a vacina de DNA uma pequena luz se acendeu no fim do túnel, indicando que pode estar aí, nessa nova técnica, o sucesso, a tão esperada vacina contra a leishmaniose humana.

REFERÊNCIAS

AIRES, J.M. et al. Maxadilan (MAX) – Proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão genica e proteica de MAX em *Lutzomyia neivai*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. São Paulo, abr. 2005. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80s3/3v80a12.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

ALBUQUERQUE, E.L. **Infecção de Macrófagos Originados de Monócitos primários humanos com o parasito *leishmania Amazonensis* em Microambientes Monoxico e Hipoxio**. 2006. 76f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campinas. São Paulo, 2006.

BATISTA, C.M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Recife - PE, abr.-jun. 2007. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n2/02.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BONETTI, F.C. **Estudo do Uso da Radiação Ionizante como Ferramenta de Seleção de Formas Promastigotas Metacíclicas de *Leishmania Amazonensis*, e a Indução de Resposta Imunológica em Modelos Experimentais**. 2006. 80f. Dissertação (Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

CASTRO, J.M.A. **Avaliação da Utilização de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 como Adjuvante na Vacinação contra *Leishmania braziliensis***. 2005. 96 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2005.

FOLGUEIRA, C. et al. The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. **BioMed Central Ltd**. Madrid, 21 January 2010. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

FUMAGALLI, M.A.C. **Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *phage display* e *spot synthesis***. 2008. 98 f. (Dissertação Pós-Graduação). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiológica**, Belo Horizonte, 20 set. 2004. Disponível em: < http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S1415-790X2004000300011&script=sci_arttext&tlng=pt >. Acesso em: 10 Mar. 2010.

IBORRA, S. et al. The *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal Protein P0 Administered as a DNA Vaccine Confers Protective Immunity to *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. **INFECTION AND IMMUNITY**. Madrid, 8 August 2003. Disponível em: < <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/71/11/6562> >. Acesso em: 20 jun. 2010.

MORA, A.M. et al. Protection of c57bl/10 Vice by Vaccination With Association of Purified Proteins from *Leishmania (leishmania) Amazonensis*. **Revista.do Instituto. Medicina.tropical**, Sao Paulo, Julho - Agosto. 1999. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rimts/v41n4/v41n4a09.pdf> >. Acesso em: 25 Mar. 2010.

MORRIS, R.V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **The Journal of Immunology**. Boston, 23 Ago. 2001. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/167/9/5226> >. Acesso em: 20 jun. 2010.

NASCIMENTO, I.P. et al. BCG na vacinação contra Leishmaniose. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, 08 jun. 2009. Disponível em: < www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article1040 - >. Acesso em: 02 Mar. 2010.

NETTO, M.B.; BARRAL, A. Imunização Especifica Nas Leishmanioses Tegumentares Revisão. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, abr/jun. 1987. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/mioc/v82n2/vol82%28f2%29_134-143_100.pdf >. Acesso em: 25 jun. 2010.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

PEIXOTO, M.A.S. **Forma mucosa da leishmaniose tegumentar Americana: Histopatológico e Imuno-Histoquímico de casos do Hospital Universitário de Brasília**. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasília, 2005.

RAMIREZ, L. et al. BALB/cMice Vaccinated with Leishmania major Ribosomal Proteins Extracts Combined with CpG Oligodeoxynucleotides Become Resistant to Disease Caused by a Secondary Parasite Challenge. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Madrid, 29 October 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/181690.html>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

REY, Luis. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

_____. _____. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009

Sachdeva, R. et al. Immunogenicity and Efficacy of Single Antigen Gp63, Polytope and PolytopeHSP70 DNA Vaccines against Visceral Leishmaniasis in Experimental Mouse Model. **PLoS ONE**, United States of America, 2 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007880>>. Acesso em: 05 Mar. 2010.

SANTOS, L.E.R. **Microesferas lipídicas encapsuladas com proteínas antigênicas da membrana de leishmania amazonensis com potencial aplicação terapêutica**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2009.

TEIXEIRA, C. et al. Influência da Saliva de flebotomíneos na Leishmaniose Experimental e Humana. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, 27 mai. 2005. Disponível em:<http://www.medicina.ufba.br/gmbahia/numeros/n_1_2005/1_2005.pdf#Page=27>. Acesso em: 05 Mar. 2010.