

## ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA: LIÇÕES DOS MODELOS EXPERIMENTAIS

### VACCINATION STRATEGIES AGAINST VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS: LESSONS FROM THE EXPERIMENTAL MODELS

Natália M. Tavares, Diego M. Santos, Camila I. de Oliveira, Cláudia I. Brodskyn  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / FIOCRUZ; Salvador, BA, Brasil

Leishmanioses são doenças transmitidas por vetores causadas pelo parasito intracelular *Leishmania*, responsável por significativa morbidade e mortalidade no mundo, constituindo um importante problema de saúde pública. Uma vez que não há método preventivo disponível e que a terapia com drogas é tóxica e já apresenta resistência, o desenvolvimento de uma vacina é cada vez mais importante. O fato de que a recuperação de uma primeira infecção confere proteção contra uma re-infecção sugere que o controle das leishmanioses através da vacinação é possível. Além disso, muitas evidências a partir de estudos com modelos experimentais indicam que a proteção pode ser gerada pela imunização com antígenos do parasito e/ou do vetor. Esta revisão aborda às estratégias envolvidas no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose experimental visceral e a leishmaniose cutânea e os recentes achados nesta área de pesquisa.

**Palavras-chaves:** *Leishmania*, vacina, leishmaniose, modelos experimentais.

*Leishmaniasis are vector-borne diseases caused by the intracellular protozoan parasite Leishmania, which cause significant morbidity and mortality worldwide and therefore constitute an important public health problem. Since no prevention method is available, drug therapy is toxic and drug resistance is growing, vaccine developments against this important pathogen is paramount. The fact that recovery from a primary infection confers protective immunity against re-infection suggests that control of leishmaniasis by vaccination is possible. Also, extensive evidence from studies in experimental models indicates that solid protection can be achieved by immunization with parasite and/or vector antigens. This review focuses on the strategies currently employed for the development of vaccines against visceral and cutaneous experimental leishmaniasis and the recent findings obtained in experimental models of infection.*

**Key words:** *Leishmania*, vaccine, leishmaniasis, experimental models.

#### Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença afeta dois milhões de pessoas em praticamente todos os continentes, com exceção da Oceania, e é endêmica em 88 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o planeta vivem sob risco de infecção, 12 milhões de pessoas estão infectadas e, a cada ano 1,5 a 2 milhões de novos casos surgem, causando 57 mil mortes anualmente<sup>(159)</sup>. A infecção por *Leishmania* causa diferentes manifestações clínicas que estão relacionadas ao desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro e com a espécie da *Leishmania*<sup>(61)</sup>.

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) era considerada uma endemia focal e rural até a década de 80 do século XX. No entanto, ocorreu uma expansão para regiões peri-urbanas, periferias de alguns centros urbanos e epidemias

urbanas foram observadas em várias cidades nos últimos anos. A LVA ocorre com maior incidência na região Nordeste, somando 92% dos casos, 66% destes na Bahia, Maranhão, Ceará e Piauí. De modo similar, houve expansão geográfica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) após 1985, com aumento no coeficiente de detecção de 10,45/100.000 habitantes para 18,63/1000.000 habitantes, e, atualmente, há relatos da doença em todas as regiões do país. Com uma média anual de 28.568 casos, a região Norte apresentou as maiores incidências entre 1985 e 2005. Em 2001, por exemplo, a incidência foi de 93,84 casos por 100.000 habitantes<sup>(16, 17)</sup>.

Nesta revisão, foram abordados brevemente os principais trabalhos sobre desenvolvimento de vacinas, nos modelos animais mais relevantes para o estudo da leishmaniose.

#### Modelos experimentais em leishmaniose visceral (LV)

Camundongos e hamsters têm sido amplamente empregados como modelos experimentais para o estudo da LV. Diferentes linhagens de camundongos são geneticamente susceptíveis ou resistentes à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*<sup>(96)</sup>. Entretanto, mesmo aqueles susceptíveis são capazes de controlar a infecção por *L. donovani* ou *L. chagasi*<sup>(103)</sup>. Dessa forma, modelos murinos não são os ideais para se avaliar a infecção visceral, caracterizada por sua progressão e disseminação, comumente vistas em humanos.

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dra. Cláudia I. Brodskyn. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel.:55 71 3176-2211. Endereço eletrônico: brodskyn@bahia.fiocruz.br.

Um dos modelos mais apropriados para o estudo da LV progressiva é o hamster, no qual a infecção por *L. donovani* causa hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia e pancitopenia<sup>(94)</sup>. Estas características mimetizam de modo muito próximo a infecção grave observada em humanos. Uma vez que não há rota intravenosa para infectar hamsters, por conta do reduzido tamanho da cauda, a inoculação do parasito é comumente feita por via intracardiaca, que é tecnicamente difícil e prejudicial ao animal, além da necessidade de alto inóculo<sup>(9, 14, 95)</sup>. Além disso, esta via de infecção não mimetiza a transmissão natural dos parasitos pela picada do vetor na pele do hospedeiro vertebrado. O primeiro relato da infecção por via intradérmica em hamsters demonstrou os aspectos histológicos iniciais da leishmaniose visceral causada por *L. donovani*<sup>(160)</sup>. Em seguida, outros grupos reproduziram este modelo com resultados positivos<sup>(5, 55, 57)</sup>.

Os cães também são bons modelos para estudar as leishmanioses. Esta espécie é alvo para o controle desta zoonose em áreas endêmicas e apresenta similaridade de sintomas com os humanos<sup>(1)</sup>. Infecções experimentais em cães têm sido relatadas desde o século 20, quando o papel de reservatório destes animais foi confirmado<sup>(39, 101)</sup>. Por fim, modelos de primatas não-humanos auxiliam na compreensão dos mais diversos aspectos sobre interações entre parasito e hospedeiro devido à sua relação filogenética muito próxima aos humanos. Os primeiros esforços para estabelecer a leishmaniose visceral em macacos demonstraram que os macacos-coruja (*Aotus trivirgatus*) e os macacos-esquilo (*Saimiri sciureus*) desenvolviam uma infecção fatal, mas curta<sup>(26, 27)</sup>. Espécies de macacos do Velho Mundo desenvolveram infecções baixas ou inconsistentes<sup>(41)</sup>. Tentativas de estabelecer a leishmaniose visceral em *Presbytis entellus* mostraram que esta espécie é altamente susceptível, produzindo infecção aguda fatal consistente e progressiva. Estes animais apresentaram os fatores clínico e imunopatológicos observados no calazar humano<sup>(7, 43)</sup>. O langur indiano (*Trachypithecus geei*) também tem sido utilizado em avaliações pré-clínicas de drogas anti-*Leishmania*<sup>(134)</sup> e vacinas<sup>(42, 97)</sup>.

### Vacinas para leishmaniose visceral

#### Vacinas de primeira geração

Muitas estratégias de vacinação que utilizam parasitas vivos, atenuados ou antígenos definidos têm sido empregadas contra a leishmaniose cutânea<sup>(67)</sup>. A "leishmanização" é descrita como a estratégia de imunização mais bem sucedida em humanos e desenvolve imunidade duradoura após infecção induzida com parasitas viáveis não-atenuados<sup>(18, 60)</sup>. Uma vez que vacinas com parasitos vivos mimetizam o curso natural da infecção e induzem imunidade após a cura, sua utilização é promissora, porém não segura. O caráter protetor da vacinação de roedores com *Leishmania* viva de espécies não-patogênicas, como *L. tarentolae*, já foi demonstrado. A imunização única de camundongos BALB/c com *L. tarentolae* induz imunidade protetora contra um

desafio com *L. donovani* infectiva<sup>(18)</sup>. No entanto, por questões de segurança, isso foi restringido, uma vez que não é possível utilizar este tipo de abordagem profilática. Em contrapartida, a possibilidade de vacinação com parasitos vivos atenuados tem sido de grande interesse porque, além de mimetizar o curso da infecção, grande quantidade de antígeno é depositada, assegurando a indução de uma resposta imune protetora<sup>(136)</sup>. Uma das primeiras abordagens utilizando este método demonstrou que parasitas irradiados geraram imunidade protetora em camundongos contra a infecção fatal por *L. tropica*<sup>(70)</sup>. Parasitos modificados em genes essenciais que interferem na sobrevivência destes em células hospedeiras foram testados como potenciais vacinas. *L. infantum* deficiente para a proteína codificada pelo gene *SIR2* (*LiSIR2*<sup>+/-</sup>) apresentam redução na proliferação e infecção *in vitro* e *in vivo*<sup>(155)</sup>. Este gene está envolvido com a desacetilação das histonas, levando à condensação da cromatina e silenciamento da transcrição gênica<sup>(49)</sup>, progressão do ciclo celular, estabilidade cromossômica<sup>(15)</sup> e reparo do DNA<sup>(153)</sup>. Estes mutantes foram, então, avaliados em sua capacidade de promover proteção frente a um desafio com *L. infantum*<sup>(137)</sup>. Foi demonstrado que parasitas *LiSIR2*<sup>+/-</sup> são capazes de invadir órgãos viscerais, mas não persistem e que a vacinação com esta cepa atenuada protege contra uma cepa virulenta. Esta proteção correlaciona-se com o aumento na razão IFN- $\gamma$ /IL-10, com resposta celular e humoral específica anti-*Leishmania*<sup>(137)</sup>. A geração de espécies de *Leishmania* mutantes para genes alvos essenciais para seu crescimento, como os transportadores da Pterina (*BTI*), também foi avaliada<sup>(151)</sup>. Camundongos BALB/c imunizados com *L. donovani* mutante (*L.d. BTI KO*) apresentaram redução na carga parasitária quando desafiados com cepa selvagem, relacionada com aumento na produção de IFN- $\gamma$  no baço<sup>(112)</sup>. Embora atenuados, estes parasitas podem reverter esta situação e tornarem-se infectivos, levando ao desenvolvimento de doença.

#### Vacinas de subunidades

A vacina de subunidades surge como um refinamento, onde componentes do parasita são purificados e utilizados como estratégia vacinal. A identificação de antígenos que induzem resposta de células T é um passo crítico no desenvolvimento da vacina, uma vez que o perfil antigênico varia com as espécies, bem como o reconhecimento destes, entre diferentes hospedeiros<sup>(31, 79, 104)</sup>. Considerando a estratégia de invasão da *Leishmania*, as moléculas da superfície do promastigota são as primeiras proteínas a entrar em contato com as células do hospedeiro vertebrado. Diferentes cepas de *L. donovani* tiveram suas proteínas de membrana purificadas<sup>(15)</sup> e avaliadas em seu potencial protetor como vacina<sup>(48)</sup>. De modo semelhante às espécies envolvidas com a forma cutânea da doença<sup>(24, 36, 53)</sup>, hamsters imunizados com tais proteínas apresentaram redução de carga parasitária. Além disso, foi observada resposta linfoproliferativa nestes animais<sup>(48)</sup>, caracterizando o papel protetor desta estratégia

vacinal. Recentemente, a utilização de frações solúveis de promastigotas de *L. donovani* como vacina de subunidades foi avaliada neste mesmo modelo experimental. Dentre as sete frações testadas de 68 a 97.4 kDa, apenas quatro, administradas individualmente ou em sub-grupos, estimularam intensa resposta Th1, óxido nítrico, IFN- $\gamma$  e IL-12<sup>(88)</sup>. A imunização de hamsters com frações antigênicas de alto peso molecular obtidas a partir de *L. donovani* também induziu a redução da carga parasitária e produção de óxido nítrico<sup>(152)</sup>. No entanto, a utilização de subunidades combinadas na imunização de cães não levou a proteção contra *L. infantum*<sup>(59)</sup>. Neste trabalho, a poliproteína recombinante de *Leishmania* MML, também conhecida como Leish-111f, foi gerada a partir de três antígenos capazes de induzir imunidade celular<sup>(20, 157, 158)</sup>. Os autores argumentam que diferenças na apresentação de epitopos entre a combinação podem gerar resultados contrastantes, como observado na quase ausência da resposta linfoproliferativa nestes cães. Além disso, estes resultados enfatizam as diferenças nos padrões de imunidade protetora entre diferentes modelos de infecção.

#### Vacinas de DNA

Diante das dificuldades encontradas no preparo e purificação de frações do parasita, a vacina de DNA surge como alternativa de candidatos potenciais para vacinação contra a leishmaniose. A maioria dos trabalhos envolvendo esta estratégia é voltada para infecções virais, onde a indução de resposta citotóxica é crucial para a resolução da doença<sup>(71)</sup>. Vacinas de DNA são relativamente simples de produzir, administrar e, sob condições ideais, são altamente imunogênicas. Na tentativa de identificar possíveis candidatos<sup>(93)</sup>, demonstraram que a imunização com frações sequenciais de cDNA da biblioteca de *L. donovani* é uma excelente ferramenta na identificação de candidatos para vacina<sup>(93)</sup>. O potencial protetor do antígeno LACK (receptor homólogo da cinase C ativada de *Leishmania*) foi demonstrado contra a infecção por *L. major*<sup>(65)</sup> e é altamente conservado, sendo expresso por *L. donovani*<sup>(102)</sup>. Utilizando modelo murino, este mesmo grupo demonstrou que, embora a vacina de DNA expressando LACK induzisse uma forte resposta imune do tipo Th1, ela não protegeu contra o desafio por *L. donovani*<sup>(94)</sup>. Em contrapartida, Gomes e colaboradores, em 2007, demonstraram que a administração por via intranasal do DNA que codifica o LACK induziu proteção de camundongos contra a infecção por *L. chagasi*<sup>(56)</sup>. No entanto, as vacinas de DNA ainda podem ser aperfeiçoadas. Um importante fator de virulência de *L. donovani* é o gene A2 expresso em níveis maiores em amastigotas que, quando deficientes neste gene, perdem sua capacidade proliferativa<sup>(162, 163)</sup>. Embora o potencial antigênico de A2 já tenha sido demonstrado em pacientes acometidos pela doença<sup>(51)</sup>, seu papel protetor contra a infecção por *L. donovani* foi avaliado em conjunto com a proteína E6 do Papilomavirus Humano (HPV). Esta proteína é capaz de mediar a degradação do p53, proteína celular responsável pela manutenção da integridade do DNA e que,

quando ativada, pode induzir apoptose<sup>(89)</sup>. A imunização conjunta de camundongos com plasmídeos expressando E6 e A2 resultou em maior resposta imune contra A2 do que o plasmídeo A2 sozinho, associada à proteção contra a infecção<sup>(52)</sup>.

Apostando no potencial das vacinas de DNA, a proteína PapLe22 do núcleo de promastigota *L. infantum* foi avaliada. Hamsters foram imunizados uma única vez por via intramuscular e apresentaram 50% de redução na ocorrência de episódios de *L. infantum* na circulação. A relevância deste achado está no fato de prevenir a transmissão da *Leishmania* e, então, contribuir para o controle da doença<sup>(47)</sup>. Outros antígenos candidatos também foram testados, como o KMP-11 (Proteína 11 da Membrana no Cinetoplasto). A imunização de hamsters com o plasmídeo que codifica o KMP-11 induziu proteção contra *L. donovani* resistente ou não ao Antimônio Pentavalente, principal forma de tratamento adotada atualmente<sup>(9)</sup>. Embora a maioria dos dados obtidos de estudos sobre candidatos a vacina contra Leishmaniose Visceral seja positiva, o potencial protetor destas imunizações foi apenas parcial. Além disso, o polimorfismo nas moléculas do MHC gera uma heterogeneidade de resposta nas populações, onde alguns indivíduos são alto-respondedores a um antígeno e baixo-respondedores a outro<sup>(67, 114)</sup>.

Com base nesses achados, uma vacina de DNA multicompetente foi testada em cães contra a infecção por *L. donovani*. Esta vacina é uma combinação de plasmídeos codificantes de proteínas de *L. donovani* que já foram demonstradas isoladamente como potenciais candidatos. O resultado da imunização de cães com esta vacina foi uma resposta linfoproliferativa antígeno-específica, um padrão de citocinas do tipo 1, uma resposta de Hipersensibilidade Tardia contra parasitas viáveis e inibição da replicação dos parasitas no linfonodo de drenagem<sup>(131)</sup>. Uma outra tentativa de imunização de cães com coquetel de plasmídeos de DNA que codificam antígenos de *L. infantum*, os quais induziram proteção em modelos murinos, não obteve resultados positivos. Apesar da imunogenicidade induzida por tais plasmídeos isolados em camundongos, isso não se reproduziu em cães. Conseqüentemente, esta vacina multiantigênica não protegeu contra o desafio com *L. infantum*<sup>(126)</sup>. De modo semelhante, a combinação de histonas ribossomais de *Leishmania* não induziu proteção de camundongos contra o desafio com *L. infantum*<sup>(22)</sup>, apesar da imunogenicidade destas já ser conhecida<sup>(123)</sup>.

Ainda na tentativa de aperfeiçoamento da vacina de DNA, surgiu a metodologia denominada *prime-boost*. Nesta estratégia, há uma primeira exposição ao antígeno e, em seguida, um reforço, que podem ou não ser diferentes entre si. No caso da imunização homóloga, a primeira exposição e o reforço são do mesmo componente, por exemplo, DNA que codifica o antígeno ou a proteína recombinante. Já na imunização heteróloga há uma combinação destes diferentes componentes<sup>(58, 113, 122)</sup>. De forma distinta de outros resultados envolvendo vacinação com o antígeno LACK contra a forma

visceral da leishmaniose, a imunização de cães com a estratégia *prime-boost* levou a alto grau de proteção contra *L. infantum*. Ao avaliar o padrão de expressão gênica de citocinas, a resposta proliferativa e anticorpos nestes animais, os autores relatam proliferação Th1/Th2 inicial e predominância final Th1<sup>(120)</sup>. Tais parâmetros diferem daqueles observados em modelos murinos de visceral e se aproximam daqueles vistos em cães naturalmente infectados<sup>(91)</sup>. Recentemente, este protocolo foi avaliado em cães e induziu resposta imune do tipo Th1, levando a proteção contra *L. infantum*. Esta proteção estava associada com ausência de sintomas, baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e alto grau de ativação de células T em órgãos alvos<sup>(121)</sup>. Empregando também a vacinação heteróloga, porém com vetores expressando cisteína proteinase tipo I e II de *L. infantum*, Rafati e colaboradores demonstraram ausência de parasitas na medula óssea de cães vacinados. Além disso, os animais imunizados apresentaram aumento nos níveis de expressão de IFN- $\gamma$ <sup>(117)</sup>. Diante disto, a estratégia *prime-boost* pode ser útil como metodologia contra leishmaniose visceral canina. Esta mesma estratégia avaliada contra *L. infantum*<sup>(40, 86)</sup> e *L. chagasi*<sup>(45)</sup> em camundongos também induziu proteção.

#### Vacinas baseadas em células dendríticas

Uma outra estratégia de vacinação potencial é utilizar a biologia das células dendríticas (DCs), que são fundamentais para a iniciação e manutenção da imunidade adaptativa. DCs pulsadas com Antígeno Solúvel de *Leishmania* (SLA) induzem resposta Th1 específica contra *L. donovani* associada com proteção de camundongos contra a infecção. Além disso, DCs transformadas para secretar altos níveis de IL-12 intensificaram a resposta protetora<sup>(3)</sup>. Foi demonstrado, recentemente, que DCs pulsadas com as histonas ribossomais de *L. infantum* e CpG induziram resistência parcial contra a infecção por *L. infantum*<sup>(22)</sup>. Estes resultados indicam que a eficiência da vacina pode ser aumentada pela transferência de DCs pulsadas, porque elas migram para áreas ricas em células T nos tecidos linfóides, onde interagem e iniciam a resposta imune.

#### Vacinas baseadas na saliva do vetor

A saliva do vetor injetada durante o repasto sanguíneo na derme do hospedeiro vertebrado induz imunidade celular e humoral contra seus componentes<sup>(127, 128, 135)</sup>. Titus e Ribeiro<sup>(150)</sup> foram os primeiros a demonstrar o aumento da infecção por *Leishmania* na presença da saliva<sup>(150)</sup>. Acredita-se que este efeito é mediado pela modulação da resposta imune do hospedeiro. Estudos *in vitro* mostram que macrófagos cultivados na presença da saliva não são capazes de apresentar antígeno, produzir óxido nítrico e são refratários à ativação por IFN- $\gamma$ <sup>(66, 147)</sup>. Entretanto, é importante considerar a possibilidade da saliva agir diretamente sobre a *Leishmania*. Alguns trabalhos apontam que o contato inicial entre *Leishmania* e saliva no intestino do vetor influencia a diferenciação e a virulência do parasita<sup>(28, 29)</sup>. Independente do efeito e modo de ação da saliva, sua presença tem forte

influência no desfecho da infecção. Belkaid *et al.*, 1998<sup>(10)</sup>, relataram o potencial protetor da pré-exposição aos componentes salivares do vetor contra a infecção por *Leishmania*<sup>(10)</sup>. Logo este achado foi confirmado com outros modelos<sup>(37, 81, 148)</sup>. Recentemente, Gomes *et al.*<sup>(57)</sup> demonstraram que a imunização de hamsters com plasmídeo que codifica uma proteína da saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis*, LJM19, induziu proteção contra a infecção por *L. chagasi*<sup>(57)</sup>. As proteínas salivares de *L. longipalpis* também foram utilizadas na vacinação de cães com um esquema de múltiplas doses e diferentes formas de imunização. Os autores observaram altos títulos de anticorpos anti-saliva, produção elevada de IFN- $\gamma$  e uma intensa reação de hipersensibilidade tardia utilizando flebotomos não infectados como desafio. Estas respostas possuem potencial de proteção contra a leishmaniose visceral canina<sup>(35)</sup>. Estes dados apontam novas vias para a formulação de estratégias vacinais utilizando componentes do vetor responsável pela transmissão do parasito.

#### Adjuvantes e outros vetores

A associação dos antígenos candidatos a vacina com adjuvantes também tem sido investigada com o objetivo de se aperfeiçoar estratégias de vacinação contra a leishmaniose visceral. Assim, a utilização de IL-12 como adjuvante apresenta resultados contraditórios a depender do modelo utilizado. Sua aplicação em camundongos conferiu imunidade protetora de longa duração contra *L. donovani*<sup>(145)</sup>. Entretanto, a imunização de cães na presença da IL-12 não induziu proteção contra a infecção por *L. infantum*<sup>(115)</sup>. A saponina, cuja estrutura é composta por açúcares solúveis ligados a esteróides lipofílicos ou triterpênicos, é amplamente utilizada como adjuvante<sup>(69, 143)</sup>. A vacinação de cães com a proteína A2 recombinante e saponina como adjuvante induziu produção de IgG2 e IFN- $\gamma$ , além de proteger parcialmente contra o desafio com *L. chagasi*<sup>(44)</sup>. Outra estratégia utilizada com o objetivo de aumentar a imunogenicidade de candidatos a vacina consiste na utilização de agonistas dos PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrão), sendo que os mais conhecidos são os TLRs (Toll Like Receptors)<sup>(87)</sup>. Entre estes, a sequência CpG não metilada agonista de TLR9, tem sido empregada em inúmeros protocolos experimentais. O efeito do CpG como adjuvante foi avaliado com o antígeno recombinante de *Leishmania* ORFF em camundongos contra a infecção por *L. donovani*. A administração de ORFF ou CpG isolados resultou em proteção parcial dos animais, mas a combinação mostrou considerável redução na carga parasitária, com alta produção de IgG2a e IFN- $\gamma$ <sup>(146)</sup>. Resultados semelhantes foram obtidos a partir da imunização de camundongos com a estratégia *prime-boost*. Os animais foram inicialmente expostos ao DNA que codifica a Cisteína Proteinase III de *L. infantum* e o reforço foi feito com a proteína recombinante na presença de CpG<sup>(86)</sup>.

Lipossomos catiônicos também têm potencial de ativação da resposta imune devido à sua eficiência em direcionar o antígeno para células apresentadoras profissionais<sup>(46, 106)</sup>. A

glicoproteína gp63 purificada de *L. donovani* em formulação com lipossomos foi avaliada quanto ao seu potencial protetor em camundongos. Foi demonstrado que gp63 é altamente imunogênica em associação com tais vesículas e protege contra a infecção logo após a imunização, ou quando o desafio é realizado após 12 semanas<sup>(12)</sup>.

Vírus também são vetores potenciais na geração de vacinas contra a leishmaniose, uma vez que são eficientes em induzir imunidade protetora mediada por células do tipo Th1 e citotóxicas<sup>(19, 161)</sup>. A imunização de camundongos com Adenovirus recombinante que codifica a proteína A2 induziu células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , bem como linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Este padrão de resposta protegeu os animais contra a infecção por *L. chagasi*<sup>(124)</sup>. Juntos, os resultados destes trabalhos mostram a importância da utilização de adjuvantes por conta do seu papel no aumento da imunogenicidade dos candidatos a vacina.

### Modelos experimentais em leishmaniose cutânea

O modelo experimental mais amplamente estudado é o da infecção subcutânea de camundongos com *L. major*, no qual se empregam altas doses de parasitas ( $10^4$ - $10^7$ ), no sítio subcutâneo (base da cauda, na pata)<sup>(129)</sup>. Neste modelo foi estabelecido o paradigma da resposta Th1 e Th2, no qual os animais resistentes (C57BL/6) a infecção apresentam expansão de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, que secretam IFN- $\gamma$ , o qual leva à ativação de macrófagos e à destruição dos parasitas<sup>(63)</sup>. Uma vez curados da infecção primária, os animais ficam imunes a infecções subseqüentes, e isto se deve a persistência dos parasitas<sup>(133)</sup>. Já os animais suscetíveis (BALB/c) desenvolvem uma resposta celular do tipo Th2, que leva a produção de IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$ , citocinas que regulam de forma negativa a ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$ <sup>(63)</sup>. Assim, camundongos BALB/c infectados por *L. major* desenvolvem lesões necróticas, que levam os animais a óbito<sup>(133)</sup>. No entanto, o modelo de infecção subcutânea não reproduz determinados aspectos da biologia natural da transmissão como a inoculação de baixas doses de parasitas, a presença da saliva do vetor e o sítio de inoculação. Sendo assim, Belkaid *et al.*<sup>(10)</sup> desenvolveram um modelo de infecção intradérmico, no qual cerca de 100 a 1.000 parasitas são inoculados, na presença da saliva do vetor, na derme da orelha de camundongos. Neste modelo, o fenótipo de resistência (C57BL/6) e suscetibilidade (BALB/c) foi mantido, mas observou-se que a saliva contribuiu para a formação de lesões mais destrutivas e com maior número de parasitas. Contrastando com o modelo de *L. major*, poucos trabalhos experimentais foram desenvolvidos para caracterizar a resposta imune na infecção por *L. braziliensis*, provavelmente, devido à baixa infectividade deste parasita em modelos de camundongos<sup>(30, 107)</sup>. A linhagem de camundongos BALB/c é a mais suscetível à infecção por *L. braziliensis*, embora não desenvolva lesões severas que podem levar ao óbito, como ocorre nas infecções por *L. major*<sup>(30)</sup>. No modelo de infecção intradérmico para *L. braziliensis* desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa<sup>(37)</sup>, os parasitas

( $10^5$ ) são inoculados pela via intradérmica, na derme da orelha de camundongos BALB/c. As lesões desenvolvidas são semelhantes às observadas em pacientes com leishmaniose tegumentar: localizadas, ulceradas, com bordas elevadas e fundo granuloso<sup>(80, 90)</sup>, reforçando assim, a importância do sítio da infecção no resultado da doença<sup>(8)</sup>. Apesar do desenvolvimento da lesão, o camundongo é capaz de curar a infecção por meio de uma reposta celular mista, caracterizada pela presença de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Os parasitos são eliminados do sítio de infecção, mas persistem no linfonodo de drenagem, indicando que a resposta imune não é do tipo esterilizante<sup>(37)</sup>. Estes modelos experimentais vêm sendo amplamente empregados no desenvolvimento de vacinas.

### Vacinas para leishmaniose cutânea

#### Leishmanização

No passado foi observado que pessoas infectadas com leishmaniose desenvolvem uma úlcera benigna, que cura espontaneamente e que leva à proteção contra a re-infecção. Desta forma, foi realizada, primeiramente no Oriente-Médio, a exposição de indivíduos não infectados a picada de vetor infectado ou a inoculação destes indivíduos com material derivado de lesão. Este método de imunização, denominado leishmanização (LZ)<sup>(67, 98)</sup>, mostrou ser eficaz contra infecção por *Leishmania*. Atualmente, a LZ é feita com parasitas vivos ( $\sim 10^5$  parasitas), os quais são inoculados pela via intradérmica<sup>(84, 105)</sup> e mostrou resultados promissores contra infecção por *L. major*<sup>(84)</sup>. Neste estudo, homens adultos foram inoculados com  $5 \times 10^5$  promastigotas na via intramuscular e observou-se que 83% dos indivíduos desenvolveram lesões mais brandas, as quais permaneceram restritas ao sítio inoculado. Após a cura da lesão, os voluntários foram desafiados com a mesma quantidade de parasitas e não se observou a formação de lesão nos voluntários vacinados, indicando que a LZ é capaz de gerar proteção ativa<sup>(84)</sup>. As vantagens de utilizar parasitas vivos como forma de vacinação são: os baixos custos de produção e a facilidade de acompanhar os pacientes através do teste de Montenegro, o qual confirma se ocorreu ou não o desenvolvimento de resposta imune celular<sup>(83, 85, 99)</sup>. No entanto, o parasita pode perder sua infectividade nas sub-culturas<sup>(50)</sup> e pode ocorrer uma reativação da leishmaniose em pacientes que, por ventura, se tornem imunodeprimidos<sup>(100)</sup>.

#### Parasitas mortos

A imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com *L. major* autoclavada (ALM), na presença do adjuvante CpG, foi capaz de gerar uma proteção duradoura, tanto na linhagem suscetível, quanto na resistente<sup>(125)</sup>. Em outro estudo foi mostrado que a somente a imunização de ALM + IL-12 DNA é capaz de induzir proteção duradoura nos camundongos, diminuindo significativamente a carga parasitária para menos dez parasitas por grama de tecido<sup>(64)</sup>. Okwor *et al.*<sup>(108)</sup> mostraram diferenças na resposta imune quando imunizaram camundongos com parasitas vivos ou com mortos.

Inicialmente, os parasitas vivos induziram maior produção de IFN- $\gamma$ , enquanto os parasitas mortos induziram maior produção de IL-4. Entretanto, utilizando CpG como adjuvante, há uma mudança no padrão de resposta de Th2 para Th1, resultando em uma melhor proteção contra infecção por *L. major*. No entanto, a proteção induzida por parasitas mortos mais CpG foi de curta duração<sup>(108)</sup> quando comparado com a imunização com parasitas vivos.

### Parasitas atenuados

Como foi mostrado, a LZ é capaz de proteger tanto camundongos quanto humanos da re-infecção por *Leishmania*, mas devido a persistência do parasito, existe o perigo de reativação da doença. Desta forma, uma outra estratégia de vacinação seria a utilização de parasitas atenuados. Estas linhagens de parasitas atenuadas são capazes de infectar células fagocíticas e de persistir por um longo tempo, sem causar doença e estimulando o sistema imune<sup>(82)</sup>. Titus *et al.*<sup>(149)</sup> imunizaram camundongos BALB/c com uma cepa de *L. major* deficiente no gene da enzima dihidrofolato redutase-timidilato sintetase (DHFR-TS). Os autores mostraram que esta cepa foi incapaz de causar doença em camundongos BALB/c, normalmente suscetíveis. Entretanto, devido à rápida eliminação dos parasitos, é possível que a proteção observada não seja tão duradoura. Outra linhagem de *L. major* deficiente para o gene LPG2 (LPG2<sup>-/-</sup>) também foi capaz de induzir uma redução significativa da carga parasitária de camundongos BALB/c após a imunização, em paralelo ao não desenvolvimento de lesão cutânea<sup>(154)</sup>. Apesar dos resultados promissores obtidos com a imunização de camundongos com *L. major* LPG2<sup>-/-</sup> foi observado que os parasitas mutantes podem readquirir a capacidade de causar infecção, através de um mecanismo compensatório desconhecido<sup>(141)</sup>. Nesta mesma linha de parasitas atenuados, foi mostrado que cepas de *L. major*<sup>(6)</sup> e *L. braziliensis*<sup>(38)</sup> que super-expressam o gene do minixon, o qual tem um papel importante no processamento do RNA dos protozoários da ordem Kinetoplastida, apresentam menor virulência. Sendo assim, estas cepas também seriam potenciais candidatos para ensaios de imunização e proteção.

### Vacinas de subunidades

A leishmanolisina ou gp63 (glicoproteína de 63 kDa) é uma protease de membrana expressa tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota da *Leishmania*<sup>(67)</sup>. A imunização de camundongos BALB/c com BCG que expressa gp63 gerou proteção parcial em animais desafiados com *L. major*<sup>(36)</sup>. Em outro estudo foi observada proteção em somente 30% dos animais vacinados com gp63 DNA e nenhuma proteção utilizando gp63 recombinante<sup>(156)</sup>. Ahmed *et al.* (2004)<sup>(2)</sup> observaram uma diminuição significativa na carga parasitária e uma lesão menor em camundongos BALB/c imunizados com GP63 lipossomal + CpG e posteriormente desafiados com *L. major*<sup>(77)</sup>.

A KMP-11 (proteína de membrana da ordem dos Kinetoplastida de 11 kDa) é uma proteína de superfície de membrana, altamente conservada, presente na ordem Kinetoplastida e que está associada com o lipofosfoglicano (LPG). A KMP-11 é expressa tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota da *Leishmania*<sup>(78,142)</sup>. A vacinação de camundongos BALB/c com *Toxoplasma gondii* ts-4 transgênico que expressa a KMP-11 levou a proteção dos animais contra a infecção por *L. major*<sup>(119)</sup>. Bhaumik *et al.*<sup>(11)</sup> mostraram que camundongos BALB/c imunizados com KMP-11 DNA e desafiados com *L. major* apresentaram uma redução de 69% na carga parasitária. Já animais imunizados com KMP-11 DNA + IL-12 DNA ou com KMP-11 DNA + IL-12r mostraram redução da carga parasitária de 96,2% e 94%, respectivamente. As histonas e as proteínas ribossomais são antígenos altamente conservados que não são secretados, mas que, no entanto, são capazes de induzir uma potente resposta imune<sup>(132)</sup>. Estes chamados pan-antígenos<sup>(123)</sup> são liberados durante a infecção, após a destruição dos amastigotas intracelulares pelo macrófago ativado ou pela citólise espontânea de amastigotas dentro da célula infectada<sup>(25)</sup>. Os mesmos são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro devido ao fato de que não sofrem pressão seletiva pela resposta imune, ao contrário das proteínas de superfície e das proteínas secretadas. A imunização de camundongos BALB/c com plasmídeos de DNA que codificam histonas nucleossomais de *L. infantum* (H2A, H2B, H3 e H4) levou à proteção contra infecção e re-infecção por *L. major*<sup>(23)</sup>. A imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com extrato de proteínas ribossomais da *L. major* na presença do CpG levou a proteção destas duas linhagens contra infecção por *L. major*<sup>(74)</sup>. A imunização de camundongos BALB/c com plasmídeo de DNA que codifica uma proteína ribossomal de *L. infantum* (LiP0) levou a proteção parcial destes animais contra infecção por *L. major*<sup>(76)</sup>, enquanto a imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com LiP0 recombinante na presença do CpG não evitou a progressão da doença em BALB/c, mas protegeu em C57BL/6<sup>(73)</sup>. Assim, os pan-antígenos podem prover a capacidade imunomodulatória necessária ao desenvolvimento de vacinas.

A peptidase sinal é uma enzima essencial e tem como função remover a seqüência sinal das proteínas secretadas<sup>(110,111)</sup>. O soro de pacientes com leishmaniose cutânea ou com leishmaniose visceral mostrou ser altamente reativo para o antígeno peptidase sinal do tipo I da *L. major* (Lmjsp). Sendo assim, o Lmjsp, apesar de ter localização intracelular, seria um bom marcador para avaliar resposta imune específica a *Leishmania*, além de ser um antígeno relevante para desenvolvimento de vacinas<sup>(118)</sup>. A imunização de camundongos BALB/c com Lmjsp utilizando três estratégias diferentes (DNA, DNA + proteína e proteína+ adjuvante) mostrou uma redução da carga parasitária de 81, 70 e 66%, respectivamente. Em paralelo, houve redução no desenvolvimento da lesão de 20, 25 e 30%, respectivamente<sup>(116)</sup>. Outros candidatos a vacina de subunidades também foram

testados, mostrando diferentes graus de proteção. Camundongos BALB/c foram imunizados com o antígeno LACK (homólogo do receptor para quinase C ativada), empregando diferentes protocolos de imunização: LACK DNA e LACK proteína, na presença ou ausência de IL-12 recombinante. Neste trabalho, apenas os animais imunizados com LACK DNA e LACK proteína + IL-12 mostraram proteção contra infecção<sup>(65)</sup>. A imunização com LACK DNA também se mostrou de longa duração em animais imunizados e desafiados com *L. major* doze semanas após a última imunização<sup>(64)</sup>. Outro estudo mais recente avaliou a capacidade protetora de plasmídeos de DNA que codificam os seguintes antígenos: LACK, PSA2 (antígeno de superfície da promastigota), Gp63, LeIF (fator iniciador de alongação da *Leishmania*), além da forma truncada do LACK, o LACKp24, em camundongos BALB/c infectados com *L. major*<sup>(2)</sup>. Neste trabalho, apenas a imunização com LACK ou com a proteína truncada mostraram capacidade protetora<sup>(2)</sup>. Trabalhos prévios mostraram que os antígenos LmSTII (proteína estresse induzível da *L. major*) e TSA (oxidante tiol específico), que são dois componentes da Leish-111f<sup>(33)</sup>, são capazes de proteger camundongos BALB/c da infecção por *L. major*<sup>(20,21)</sup>. No entanto, um outro estudo mostrou que nenhum destes antígenos (separados ou em coquetel) foi capaz de proteger camundongos BALB/c contra a infecção por *L. braziliensis*<sup>(130)</sup>. É provável que diferenças biológicas entre as espécies de parasitas *L. major* e *L. braziliensis* possam contribuir para uma inabilidade na indução de uma resposta imune protetora, pois apesar das duas espécies terem uma organização genômica similar, alguns mecanismos distingue uma espécie da outra. A *L. braziliensis*, por exemplo, possui mecanismos de retrotransposons e RNAi (RNA de interferência)<sup>(139)</sup>. Por fim, a imunização de camundongos BALB/c com a Leish-111f, na presença de monofosforil lipídio A com escaleno (MPL-SE), levou a uma proteção duradoura contra *L. major*, em animais desafiados<sup>(34)</sup>.

Vacinas para leishmaniose cutânea: resultados com o modelo experimental de primatas

Primatas não humanos (PNH), como o macaco rhesus (*Macaca mulatta*), são susceptíveis a infecção por *Leishmania*, desenvolvem doença similar a humana inclusive a forma mucosa<sup>(144)</sup>, exibem resposta humoral e celular contra o parasita<sup>(62)</sup>. Como descrito acima, camundongos imunizados com *L. major* deficientes em DHFR-TS desenvolveram proteção contra infecção por *L. major*<sup>(149)</sup>. Entretanto, no modelo de PNH não foi observada proteção<sup>(4)</sup>. O mesmo aconteceu quando imunizaram PNH com *L. major* autoclavada (ALM)<sup>(4,54)</sup>, estratégia que se mostrou protetora no modelo murino de infecção<sup>(125)</sup>. A imunização com dois componentes da Leish-111f, o TSA e o LmSTII, na presença de IL-12, foi capaz de proteger PNH contra infecção por *L. major*<sup>(20)</sup>. Da mesma forma, PNH imunizados com H1 (histona 1), na presença do adjuvante Montanide, levou a proteção destes animais contra infecção por *L. major*<sup>(92)</sup>, já nos camundongos BALB/c foi relatada uma proteção parcial<sup>(140)</sup>. Da mesma maneira, a

imunização de camundongos com BCG expressando gp63 levou a uma leve diminuição da lesão<sup>(36)</sup>, enquanto que em PNH houve proteção parcial<sup>(109)</sup>. É importante salientar que uso de primatas, em testes para desenvolvimento de vacinas, deve ser reservado para estágios finais de avaliação de candidatos que mostraram proteção significativa em modelos murino. No entanto, são observadas diferenças importantes nos níveis de proteção quando se compara a mesma estratégia de imunização em camundongos e PNH.

Atualmente, é difícil avaliar qual o verdadeiro grau de proteção de uma vacina contra a leishmaniose pois são observadas discrepâncias entre os diferentes relatos da literatura. Isto se deve ao uso de diferentes antígenos; ao uso de diferentes cepas do parasita (que pode influenciar no grau de virulência); ao número de parasitas inoculados; à presença ou não da saliva do vetor no momento do desafio; à via de administração da vacina; ao número de reforços administrados antes do desafio; ao procedimento experimental e ao uso e o tipo de adjuvante. Outro ponto importante no desenvolvimento de vacinas é a ausência de um “padrão ouro” que serviria como referência para avaliar o grau de proteção. Khamesipour et al.<sup>(84)</sup> propuseram que este padrão poderia ser a leishmanização uma vez que um indivíduo infectado e curado não desenvolve doença novamente<sup>(129)</sup>.

### Considerações finais

A constatação que a infecção por *Leishmania* sp. confere proteção contra uma re-infecção, demonstra a possibilidade de obtenção de uma vacina eficaz contra as diferentes manifestações clínicas desta doença. Assim, a busca por candidatos seguros tem gerado inúmeros estudos sobre diferentes formas de vacinação. A utilização de proteínas recombinantes associadas a adjuvantes, como CpG ou lipossomos aponta para a indução de respostas protetoras. Isto também é válido para as vacinas de DNA e o emprego de outros vetores, como vírus recombinantes. Outras estratégias têm surgido nesta área como a utilização de componentes do flebótomo, como as proteínas salivares deste inseto. A resposta imune contra estas substâncias parece alterar o micro-ambiente no local da infecção, protegendo o hospedeiro, pelo menos em relação à leishmaniose visceral. Infelizmente, ainda não há uma vacina 100% eficiente e segura, mas certamente a continuidade destes estudos aliada às novas tecnologias possibilitará a elaboração de uma vacina eficaz.

### Referências

1. Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 13: 537-550, 1991.
2. Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* 22:1631-1639, 2004.
3. Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, Kostecki V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J Immunol* 163: 3890-3897, 1999.

4. Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupulillo E, Porrozzì R, Coutinho SG, Pirmez C, Beverley SM, Grimaldi JrG. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania (Leishmania) major* vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 1041-1048, 2002.
5. Anjili CO, Mbatì PA, Mwangi RW, Githure JI, Koech DK. A simple method for maintaining, detecting and recovering virulent *Leishmania donovani* in hamsters. Acta Trop 60: 263-267, 1996.
6. Antoniazzi S, Lima HC, Cruz AK. Overexpression of minixon gene decreases virulence of *Leishmania major* in BALB/c mice *in vivo*. Mol Biochem Parasitol 107: 57-69, 2000.
7. Anuradha, Pal R, Zehra K, Katiyar JC, Sethi N, Bhatia G, Singh RK. The Indian langur: preliminary report of a new nonhuman primate host for visceral leishmaniasis. Bull World Health Organ 70: 63-72, 1992.
8. Baldwin TM, Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E. The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. Infect Immun 71: 6830-6834, 2003.
9. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. J Immunol 174: 7160-7171, 2005.
10. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. J Exp Med 188: 1941-1953, 1998.
11. Bhaumik S, Basu R, Sen S, Naskar K, Roy S. KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. Vaccine 27: 1306-1316, 2009.
12. Bhowmick S, Ravindran R, Ali N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. Infect Immun 76: 1003-1015, 2008.
13. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J Biol Chem 256: 1604-1607, 1981.
14. Bories C, Coffin C, Mathieu D, Bories PN, Scherman E, Rivollet D, Deniau M. Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. Ann Trop Med Parasitol 92: 685-692, 1998.
15. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. Genes Dev 9: 2888-2902, 1995.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, 182p., 2007.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 122p., 2003.
18. Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M, Papadopoulos B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. Infect Immun 73: 6372-6382, 2005.
19. Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, et al. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. Hepatology 25: 470-477, 1997.
20. Campos-Neto A, Porrozzì R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, Grimaldi G Jr. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. Infect Immun 69: 4103-4108, 2001.
21. Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. Infect Immun 70: 2828-2836, 2002.
22. Carrión J, Folguez C, Alonso C. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. Vaccine 26: 2537-2544, 2008.
23. Carrion J, Folguez C, Alonso C. Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: the result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines. Vaccine 26: 1155-1165, 2008.
24. Champsi J, McMahon-Pratt D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. Infect Immun 56: 3272-3279, 1988.
25. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop 85: 375-390, 2003.
26. Chapman WL Jr, Hanson WL. Visceral leishmaniasis in the squirrel monkey (*Saimiri sciurea*). J Parasitol 67: 740-741, 1981.
27. Chapman JrWL, Hanson WL, Hendricks LD. *Leishmania donovani* in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). Trans R Soc Trop Med Hyg 75: 124-125, 1981.
28. Charlab R, Ribeiro JM. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. Am J Trop Med Hyg 48: 831-838, 1993.
29. Charlab R, Tesh RB, Rowton ED, Ribeiro JM. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Exp Parasitol 80: 167-175, 1995.
30. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. Ann Trop Med Parasitol 78: 25-34, 1984.
31. Christensen CB, Jorgensen L, Jensen AT, Gasim S, Chen M, Kharazmi A, Theander TG, Andresen K. Molecular characterization of a *Leishmania donovani* cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. Biochim Biophys Acta 1500: 77-87, 2000.
32. Coelho EA, Tavares CA, Lima Kde M, Silva CL, Rodrigues JrJM, Fernandes AP. *Mycobacterium hsp65* DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against *Leishmania (Leishmania) major* infection. Parasitol Res 98: 568-575, 2006.
33. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol 21: 244-249, 2005.
34. Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. Infect Immun 70: 4215-4225, 2002.
35. Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaïem DE, Fischer L, Valenzuela JG, Kamhawi S. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. PLoS Pathog 5: e1000441, 2009.
36. Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant *bacille Calmette-Guérin* expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11473-11477, 1993.
37. de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, De Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infect Immun 73: 5827-5834, 2005.

38. de Toledo JS, Junqueira dos Santos AF, Rodrigues de Moura T, Antoniazzi SA, Brodskyn C, Indiani de Oliveira C, Barral A, Cruz AK. *Leishmania (Viannia) braziliensis* transfectants overexpressing the minixon gene lose virulence *in vivo*. *Parasitol Int* 58: 45-50, 2009.
39. Desjeux P, Bryan JH, Martin-Saxton P. Leishmaniasis in The Gambia. 2. A study of possible vectors and animal reservoirs, with the first report of a case of canine leishmaniasis in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 143-148, 1983.
40. Dondji B, Pérez-Jimenez E, Goldsmith-Pestana K, Esteban M, McMahon-Pratt D. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73: 5286-5289, 2005.
41. Dube A, Murthy PK, Puri SK, Misra-Bhattacharya S. *Presbytis entellus*: a primate model for parasitic disease research. *Trends Parasitol* 20: 358-360, 2004.
42. Dube A, Sharma P, Srivastava JK, Misra A, Katiyar JC. Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *Leishmania donovani* with autoclaved *L. major* plus BCG. *Parasitology* 116: 219-322, 1998.
43. Dube A, Srivastava JK, Sharma P, Chaturvedi A, Katiyar JC, Naik S. *Leishmania donovani*: cellular and humoral immune responses in Indian langur monkeys, *Presbytis entellus*. *Acta Trop* 73: 37-48, 1999.
44. Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F, Gazzinelli RT. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26: 5888-5895, 2008.
45. Ferreira JH, Gentil LG, Dias SS, Fedeli CE, Katz S, Barbiéri CL. Immunization with the cysteine proteinase Ldcys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26: 677-685, 2008.
46. Foged C, Arigita C, Sundblad A, Jiskoot W, Storm G, Frokjaer S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* 22: 1903-1913, 2004.
47. Fragaki K, Suffia I, Ferrua B, Rousseau D, Le Fichoux Y, Kubar J. Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 19: 1701-1709, 2001.
48. Garg R, Srivastava JK, Pal A, Naik S, Dube A. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylactic potential in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 23: 1189-1196, 2005.
49. Gasser SM, Cockell MM. The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279: 1-16, 2001.
50. Ghalib H, Modabber F. Consultation meeting on the development of therapeutic vaccines for post kala azar dermal leishmaniasis. *Kinetoplastid Biol Dis* 6: 7, 2007
51. Ghedin E, Zhang WW, Charest H, Sundar S, Kenney RT, Matlashewski G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 530-535, 1997.
52. Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* 20: 59-66, 2001.
53. Gicheru MM, Olobo JO. Evaluation of recombinant gp63, the major *Leishmania* surface glycoprotein, as a diagnostic molecule for leishmaniasis in vervet monkeys. *Acta Trop* 58: 345-348, 1994.
54. Gicheru MM, Olobo JO, Anjili CO, Orago AS, Modabber F, Scott P. Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect Immun* 69: 245-251, 2001.
55. Gifawesen C, Farrell JP. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* 57: 3091-3096, 1989.
56. Gomes DC, Pinto EF, de Melo LD, Lima WP, Larraga V, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25: 2168-2172, 2007.
57. Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7845-7850, 2008.
58. Gonzalo RM, Rodríguez JR, Rodríguez D, González-Aseguinolaza G, Larraga V, Esteban M. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with *vaccinia virus* recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect* 3: 701-711, 2001.
59. Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Oliva G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23: 5245-5251, 2005.
60. Greenblatt CL. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. *Prog Clin Biol Res* 47: 259-285, 1980.
61. Grimaldi JrG. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77: 195-215, 1982.
62. Grimaldi JrG. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 629-644, 2008.
63. Gummy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 34: 433-444, 2004.
64. Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med* 4: 1409-1415, 1998.
65. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186: 1137-1147, 1997.
66. Hall LR, Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155: 3501-3506, 1995.
67. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14: 229-243, 2001.
68. Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun* 63: 4261-4267, 1995.
69. Harbone JB, Baxter H. Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants. Taylor & Francis, London, 1995.
70. Howard JG, Liew FY, Hale C, Nicklin S. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. *J Immunol* 132: 450-455, 1984.
71. Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 7: 932-938, 2005.
72. Iborra S, Abanades DR, Parody N, Carrion J, Risueno RM, Pineda MA, Bonay P, Alonso C, Soto M. The immunodominant T helper 2 (Th2) response elicited in BALB/c mice by the *Leishmania* LiP2a and LiP2b acidic ribosomal proteins cannot be reverted by strong Th1 inducers. *Clin Exp Immunol* 150: 375-385, 2007.

73. Iborra S, Carrion J, Anderson C, Alonso C, Sacks D, Soto M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun* 73: 5842-5852, 2005.
74. Iborra S, Parody N, Abanades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, Barral-Netto M, Alonso C, Soto M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect* 10: 1133-1141, 2008.
75. Iborra S, Soto M, Carrion J, Alonso C, Requena JM. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22: 3865-3876, 2004.
76. Iborra S, Soto M, Carrion J, Nieto A, Fernandez E, Alonso C, Requena JM. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 71: 6562-6572, 2003.
77. Jaafari MR, Badiee A, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, Barkhordari F, McMaster WR, Mahboudi F. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. *Vaccine* 25: 6107-6117, 2007.
78. Jardim A, Funk V, Caprioli RM, Olafson RW. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305: 307-313, 1995.
79. Jeronimo SM, Higgs E, Vedvick T, Mann BJ, Jernigan J, Petri WA Jr, Pearson RD. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. *J Infect Dis* 172: 1055-1060, 1995.
80. Jones TC, Johnson JrWD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 156:73-83, 1987.
81. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351-1354, 2000.
82. Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology* 133: 87-112, 2006.
83. Khalil EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, Ibrahim ME, Kamil AA, Elsheikh M, Babiker A, Modabber F. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356: 1565-1569, 2000.
84. Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine* 23: 3642-3648, 2005.
85. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123: 423-438, 2006.
86. Khoshgoo N, Zahedifard F, Azizi H, Taslimi Y, Alonso MJ, Rafati S. Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine* 26: 5822-5829, 2008.
87. Krieg AM. From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11: 181-188, 2001.
88. Kumari S, Samant M, Misra P, Khare P, Sisodia B, Shasany AK, Dube A. Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26: 5700-5711, 2008.
89. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
90. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846, 1984.
91. Mary C, Auriault V, Faugère B, Dessein AJ. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect Immun* 67: 5559-5566, 1999.
92. Masina S, Gicherum MM, Demotz SO, Fasel NJ. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *J Infect Dis* 188: 1250-1257, 2003.
93. Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 68: 5595-5602, 2000.
94. Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 99: 17-25, 2001.
95. Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 66: 18-27, 1998.
96. Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 62: 1058-1063, 1994.
97. Misra A, Dube A, Srivastava B, Sharma P, Srivastava JK, Katiyar JC. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. *Vaccine* 19: 3485-3492, 2001.
98. Modabber F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. *Parasitology* 98: 49-60, 1989.
99. Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasserri K, Godal T, Smith PG, Modabber F. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 17: 466-472, 1999.
100. Montalban C, Martinez-Fernandez R, Calleja JL, Garcia-Diaz JD, Rubio R, Dronda F, Moreno S, Yebra M, Barros C, Cobo J, Martinez MC, Ruiz F, Costa JR. Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Rev Infect Dis* 11: 655-660, 1989.
101. Morsy TA, Hamadto HA, Rashed SM, el-Fakahany AF, Abdalla KF. Animals as reservoir hosts for *Leishmania* in Qalyobia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 20: 779-788, 1990.
102. Mougneau E, Altare F, Wakil AE, Zheng S, Coppola T, Wang ZE, Waldmann R, Locksley RM, Glaichenhaus N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268: 563-566, 1995.
103. Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM, Nathan CF. 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* 138: 2290-2297, 1987.
104. Murray K, Stahl S, Ashton-Rickardt PG. Genetic engineering applied to the development of vaccines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 324: 461-476, 1989.
105. Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 76: 377-383, 1983.
106. Nakanishi T, Kunisawa J, Hayashi A, Tsutsumi Y, Kubo K, Nakagawa S, Nakanishi M, Tanaka K, Mayumi T. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins. *J Control Release* 61: 233-240, 1999.

107. Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. *Parasitology* 87 (Pt 1):7-13, 1983.
108. Okwor I, Liu D, Uzonna J. Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine* 27: 2554-2562, 2009.
109. Olobo, JO, Anjili CO, Gicheru MM, Mbatia PA, Kariuki TM, Githure JI, Koech DK, McMaster WR. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania major* surface glycoprotein (gp63). *Vet Parasitol* 60: 199-212, 1995.
110. Paetzel M, Dalbey RE, Strynadka NC. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol Ther* 87: 27-49, 2000.
111. Paetzel M, Karla A, Strynadka NC, Dalbey RE. Signal peptidases. *Chem Rev* 102: 4549-4580, 2002.
112. Papadopoulou B, Roy G, Breton M, Kündig C, Dumas C, Fillion I, Singh AK, Olivier M, Ouellette M. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70: 62-68, 2002.
113. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251, 1994.
114. Polvi A, Garden OA, Elwood CM, Sorensen SH, Batt RM, Mäki M, Partanen J. Canine major histocompatibility complex genes DQA and DQB in Irish setter dogs. *Tissue Antigens* 49: 236-243, 1997.
115. Poot J, Spreeuwenberg K, Sanderson SJ, Schijns VE, Mottram JC, Coombs GH, Vermeulen AN. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24: 2460-2468, 2006.
116. Rafati S, Ghaemimanesh F, Zahedifard F. Comparison of potential protection induced by three vaccination strategies (DNA/DNA, Protein/Protein and DNA/Protein) against *Leishmania major* infection using Signal Peptidase type I in BALB/c mice. *Vaccine* 24: 3290-3297, 2006.
117. Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23: 3716-3725, 2005.
118. Rafati, S, Salmanian AH, Taheri T, Masina S, Schaff C, Taslimi Y, Fasel N. Type I signal peptidase from *Leishmania* is a target of the immune response in human cutaneous and visceral leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 135: 13-20, 2004.
119. Ramirez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepulveda JC, Moll H, Soldati D, Berberich C. Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 20: 455-461, 2002.
120. Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and *vaccinia* recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21: 2474-2484, 2003.
121. Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, Larraga V. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative *vaccinia* recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26: 333-344, 2008.
122. Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21: 163-165, 2000.
123. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 16: 246-250, 2000.
124. Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CF, Verly RM, Resende JM, Piló-Veloso D, Rezende SA, Bruna-Romero O, Fernandes AP, Gazzinelli RT. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine* 26: 4585-4593, 2008.
125. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu CY, Kirman JR, Turon TN, Davey DF, Davis H, Klinman DM, Coler RN, Sacks DL, Seder RA. Vaccination with heat-killed *leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *leishmania major* infection. *J Exp Med* 195: 1565-1573, 2002.
126. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25: 7962-7971, 2007.
127. Rohousová I, Volf P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol* 53: 161-171, 2006.
128. Rohousová I, Volf P, Lipoldová M. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunol* 27: 469-473, 2005.
129. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858, 2002.
130. Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbieri CL, Rodrigues MM. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1173-1181, 2007.
131. Saldarriaga OA, Travi BL, Park W, Perez LE, Melby PC. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24: 1928-1940, 2006.
132. Santarem N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J, Cordeiro-da-Silva A. Immune response regulation by *leishmania* secreted and nonsecreted antigens. *J Biomed Biotechnol* 2007: 85154, 2007.
133. Scott PA, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis: disseminated leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice. *Am J Trop Med Hyg* 31: 230-238, 1982.
134. Sharma P, Singh N, Garg R, Haq W, Dube A. Efficacy of human b-casein fragment (54-59) and its synthetic analogue compound 89/215 against *Leishmania donovani* in hamsters. *Peptides* 25: 1873-1881, 2004.
135. Silva F, Gomes R, Prates D, Miranda JC, Andrade B, Barral-Netto M, Barral A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72: 94-98, 2005.
136. Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouaisi A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp* 56: 123-126, 2008.
137. Silvestre R, Cordeiro-Da-Silva A, Santarém N, Vergnes B, Sereno D, Ouaisi A. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. *J Immunol* 179: 3161-3170, 2007.
138. Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, Handman E. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine* 16: 2077-2084, 1998.
139. Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from

- genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37: 1173-1186, 2007.
140. Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacquet R, Rafati S, Corradin G, Mael J, Fasel N. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 18: 850-859, 1999.
  141. Spath GF, Lye LF, Segawa H, Turco SJ, Beverley SM. Identification of a compensatory mutant (Ipg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infect Immun* 72: 3622-3627, 2004.
  142. Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, Jardim A, Olafson RW, Tuckey C, Prenevost KD, Pearson TW. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* 71: 1-13, 1995.
  143. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27: 1787-1796, 2009.
  144. Teva A, Porrozi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi JrG. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 127: 437-447, 2003.
  145. Tewary P, Saxena S, Madhubala R. Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24: 2409-2416, 2006.
  146. Tewary P, Sukumaran B, Saxena S, Madhubala R. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine* 22: 3053-3060, 2004.
  147. Theodos CM, Titus RG. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol* 15: 481-487, 1993.
  148. Thiakaki M, Rohousova I, Volfova V, Volf P, Chang KP, Soteriadou K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect* 7: 760-766, 2005.
  149. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, Freitas LA, Beverley SM. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10267-10271, 1995.
  150. Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 23: 1306-1308, 1988.
  151. Trager W. Pteridine requirement of the hemoflagellate *Leishmania tarentolae*. *J Protozool* 16: 372-375, 1969.
  152. Tripathi P, Gupta SK, Sinha S, Sundar S, Dube A, Naik S. Prophylactic efficacy of high-molecular-weight antigenic fractions of a recent clinical isolate of *Leishmania donovani* against visceral leishmaniasis. *Scand J Immunol* 68: 492-501, 2008.
  153. Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388: 900-903, 1997.
  154. Uzonna JE, Spath GF, Beverley SM, Scott P. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol* 172: 3793-3797, 2004.
  155. Vergnes B, Sereno D, Tavares J, Cordeiro-da-Silva A, Vanhille L, Madjidian-Sereno N, Depoix D, Monte-Alegre A, Ouaisi A. Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. *Gene* 363: 85-96, 2005.
  156. Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, Vogel JC. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 9: 1899-1907, 1998.
  157. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66: 3279-3289, 1998.
  158. Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 157: 5034-5041, 1996.
  159. WHO. Weekly epidemiological record. 365-372. 2002
  160. Wilson ME, Innes DJ, Sousa AD, Pearson RD. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol* 73: 55-63, 1987.
  161. Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 69: 2004-2015, 1995.
  162. Zhang WW, 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.
  163. Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8807-8811, 1997.