

IMUNIZAÇÃO ESPECÍFICA NAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES REVISÃO

M. BARRAL-NETTO & A. BARRAL

Departamento de Anatomia Patológica e Laboratório de Imunologia – Hosp. Prof. Edgard Santos – UFBA,
Rua João das Botas, s/nº – Canela, 40140, Salvador, BA, Brasil

Specific immunization against tegumentary leishmaniasis (A Review) – *We have reviewed the literature on specific immunoprotection against tegumentary leishmaniasis. Papers dealing with human beings as well as with experimental animals have been included. The review is divided into three main topics: 1) Studies attempting protection by using virulent parasites of the same strain; 2) The use of parasites, virulent or not, for preventing other strains of Leishmania; and 3) The use of “attenuated” parasites, or parasite products, for inducing protection against the infection.*

Key words: leishmaniasis – tegumentary leishmaniasis – immunization

Há numerosos relatos de tentativas de vacinação de seres humanos ou de animais experimentais contra diferentes parasitas do gênero *Leishmania*. As tentativas mais numerosas, e mais frutíferas, têm sido nas leishmanioses tegumentares. Mesmo na forma visceralizante o parasita deve penetrar através da pele e assim uma imunidade manifesta a este nível seria também importante para a proteção contra o Calazar (Manson-Bahr, 1961). Esta revisão, contudo, se concentrará nos estudos de imunoprofilaxia das leishmanioses tegumentares. Antes mesmo de iniciar a discussão sobre estas diversas abordagens é necessário redefinir o uso amplo do termo “vacinação” encontrado na literatura mais antiga. Tal situação decorre da denominação “vacina de leishmania” em referência ao teste de hipersensibilidade cutânea tardia com antígenos de *Leishmania*, ou reação de Montenegro (Montenegro, 1926). Esta denominação se estende de 1935 a 1962 (Dostrovsky, 1935; Sagher, 1947; Pifano, 1962) mas a reação de Montenegro não será objeto desta revisão.

As diversas tentativas de imunização podem ser divididas, de acordo com o tipo de material empregado e com a classe de proteção, em três categorias: 1. Uso de parasitas virulentos na proteção de infecção homóloga; 2. Uso de parasitas virulentos ou não na proteção de infecção heteróloga; 3. Uso de parasita “atenuados” ou de produtos parasitários.

USO DE PARASITAS VIRULENTOS NA PROTEÇÃO DE INFECÇÃO HOMÓLOGA

Neste caso utiliza-se como agente imunizante o mesmo parasita responsável pela lesão que se procura proteger. Ressaltam imediatamente as grandes limitações de tal procedimento dos

quais a possibilidade de desenvolvimento de formas graves da doença é a principal. É mandatório, nesta abordagem, existir a segurança que os prejuízos causados pela vacinação sejam menores que os provocados pela doença que se busca proteger. O processo só pode, assim, ser empregado utilizando-se parasitas reconhecidamente causadores de formas autolimitadas da doença. Nenhuma das espécies causadoras de leishmaniose nas Américas poderia ser assim classificada. Disto decorre o uso extremamente limitado desta abordagem com as leishmanias americanas. Lainson & Strangways-Dixon (1963) tentaram a proteção contra infecções maciças por *L. mexicana* através da infecção com o mesmo parasita utilizando um número baixo de parasitas e em local diferente da orelha. Imunização por tal método é empregada principalmente com a *L. major* (referida aqui em diversas passagens como *L. tropica* para seguir a denominação utilizada pelos autores citados).

O emprego da vacina com formas promastigotas vivas encontra duas justificativas principais: a escolha do local da lesão, já que na vacinação se escolhe uma área não exposta do corpo, e a possibilidade de induzir lesão única.

A infecção natural determina freqüentemente lesões múltiplas e atinge com freqüência a face. Além disso, após a vacinação o indivíduo pode ter um acompanhamento médico desde uma etapa precoce no desenvolvimento da lesão. Há também a possibilidade de que a imunização acelere o curso de uma infecção natural adquirida durante a infecção imunizante, já que as lesões subseqüentes tendem a atingir o grau de evolução das lesões mais antigas, a chamada reação isofásica (Dostrovsky et al., 1952).

Em oposição a estes benefícios se colocam os problemas causados por este tipo de vacinação, como: possibilidade de desenvolvimento de lesões extensas ou múltiplas, algumas vezes igualando os casos mais graves de infecção natural (Zuckerman & Sagher, 1963). O desenvolvi-

Trabalho realizado com apoio do CNPq e do National Institutes of Health (AI-16.282).

Recebido em 06 de junho de 1986.

Aceito em 14 de dezembro de 1986.

mento de infecções secundárias na úlcera da vacina, em alguns estudos chega a 25% da população vacinada, e o desenvolvimento de reações alérgicas tem sido observado em pacientes já sensibilizados. Salienta-se ainda uma possível protenciação de complicações relacionada principalmente com a recrudescência ou aparecimento de psoríase (revisto em Greenblatt, 1980).

De importância também é o fato de que a inoculação de números muito baixos de parasitas, determinando infecção subclínica em animais, não confere proteção. Desta maneira parece necessário que haja o desenvolvimento da úlcera, seguida de cicatrização, para o aparecimento do efeito protetor (Schnur, 1976). Além do que, no Iraque a resistência conferida pela infecção natural parece ser de aparecimento tardio, desenvolvendo-se no 5º ou 6º mês após a infecção (Guirges, 1971), o que chega a limitar o emprego da reação de Montenegro, como método diagnóstico (Bray et al., 1967).

Outro fator importante a analisar é que o uso de tal esquema se baseia na observação de que a infecção confere proteção contra a reinfeção. Embora isto pareça ser a situação mais freqüente não acontece todas as vezes; há evidências tanto de reinfeção natural como experimental em seres humanos (Guirges, 1971).

O emprego de organismos virulentos como imunização contra a *L. major* é bastante antigo, e ainda hoje empregado, principalmente na União Soviética e em Israel (revisto em Greenblatt, 1980 e Mauel, 1982).

A primeira tentativa de proteção de indivíduos humanos com a vacina viva foi realizada na União Soviética (Lawrow & Dubowskoj, 1937), obtendo cerca de 80% de infecções imunizantes. O uso do procedimento no homem tornou menos necessário o desenvolvimento de modelos experimentais, o que se reflete na escassez de trabalhos em animais (Coutinho, 1954 a, b; Schnur, 1976).

Para o conhecimento das melhores condições de obtenção do efeito protetor da infecção por *L. tropica*, Berberian desenvolveu um grande esforço. Estudando 44 indivíduos avaliou o efeito de parasitas obtidos de diferentes passagens em cultivo e a dependência do número de lesões na proteção contra novas infecções artificiais e ainda o valor diagnóstico da inoculação dos parasitas em casos de difícil diagnóstico (Berberian, 1939). Acabou por recomendar a vacinação, baseado na facilidade de realização e por tratar-se de procedimento inócuo. Pouco mais tarde, Senekji & Beattie (1941), realizaram estudo mais amplo, envolvendo o acompanhamento de 200 indivíduos vacinados, e a re-inoculação em diferentes períodos. Concluíram que não se desenvolve imunidade senão parcial e que a imuni-

dade só aparece tardiamente (após a cicatrização da úlcera). Berberian (1944a) confirmou tais observações, e avaliou ainda o período de incubação (Berberian, 1944b) e o período de infectividade de cultivos mantidos em temperatura ambiente (Berberian, 1944c), evidentemente preocupado com o uso da "vacina" no campo.

Também neste período se realizavam os primeiros estudos do emprego da "vacina" viva em populações em Israel. Katzenellenbogen (1942) inicialmente inoculou 167 pessoas, comparando o efeito obtido com o emprego de promastigotas de cultivo com o de amastigotas isoladas de baços de hamsters infectados. Notou que o desenvolvimento de ulcerações foi semelhante nos dois grupos, o que confirmava a possibilidade de "vacinação" sem utilizar material das lesões humanas ou de outros animais. Outra grande vantagem deste estudo foi a demonstração da eficácia da "vacina" em condições de infecção natural, já que nos estudos anteriores a infecção desafio havia sido feita em laboratório. O mesmo autor ampliou os seus estudos vacinando um grupo de 555 indivíduos, e concluiu pela efetividade do método até para reduzir a incidência de leishmaniose numa área hiperendêmica. Salientou ainda a quase ausência de efeitos colaterais, o que o levou a recomendar o método mesmo para crianças (Katzenellenbogen, 1944). Mais tarde, autores soviéticos concluíram que a idade mínima para vacinação deveria ser de 7 anos, baseados na observação de que a infecção leishmaniótica induzida para imunização deprime a resposta à dose reforço de DPT (Serebriakov et al., 1972, citado por Greenblatt, 1980).

Os estudos subseqüentes sobre a vacinação em Israel foram principalmente realizados em elementos das forças armadas. Em 1970 Naggan et al., realizam uma importante avaliação do papel da imunização associado a medidas profiláticas e educativas. Neste estudo dois grupos de soldados são alojados em áreas após o uso de DDT e feita a recomendação do uso de repelentes de inseto, além de serem dadas informações sobre saúde; porém em somente um dos grupos se realizou a imunização ativa, três semanas antes do deslocamento para a área endêmica. A freqüência de leishmaniose foi maior no grupo não vacinado que no vacinado (40,5% contra 26,6%, $p < 0.02$), e também o número de lesões por indivíduos foi maior (4,6 contra 2,5, respectivamente).

Um aspecto relevante a ser observado era a capacidade de imunização da *Leishmania* utilizada na infecção. Em estudo realizado utilizando uma cepa isolada 5 anos antes Gunders et al. (1972) observaram uma taxa significativa de indivíduos que não desenvolveram lesão, ou que desenvolveram uma lesão nodular e não a lesão

ulcerosa clássica. Alguns destes indivíduos foram revacinados com uma cepa recém-isolada e apresentaram lesões de "pega". Outro grupo de indivíduos foi vacinado com uma cepa isolada há apenas 5 meses, e oriunda de uma área de alta endemicidade (Jericó), e todos mostraram "pega" (Naggan et al., 1972). Revendo os estudos realizados nas forças armadas israelenses Koufman et al. (1978) mostraram que com o passar dos anos a taxa de "pegas" caiu de cerca de 86% para 21%, quando utilizada a mesma cepa na imunização, salientando a perda de capacidade infectante do parasita após múltiplas passagens. Mais recentemente foi observado que mesmo os indivíduos que não apresentam sinais de "pega" após a imunização podem estar protegidos (Nadim et al., 1983). Neste estudo, durante o acompanhamento por um período de 2 anos, somente 0,8% dos indivíduos vacinados e com "pega", e 10,5% dos sem "pega", desenvolveram infecção natural, enquanto que 40% do grupo controle foi infectado.

A variabilidade da infectividade do parasita, e o desenvolvimento de uma "vacina" que pudesse ser mantida em boas condições e utilizada na área endêmica (longe dos recursos laboratoriais para manutenção dos parasitas) levaram os autores israelenses a pesquisar sobre a padronização do material e a sua estocagem (Handman et al., 1974; Witztum et al., 1979). Recentemente Green et al. (1983b) testaram a aplicabilidade de uma vacina de promastigotas congeladas superando assim uma das dificuldades do emprego da vacina em grandes grupos populacionais na área endêmica.

Estudando 24 indivíduos, 12 meses após a vacinação, com promastigotas de *L. major*, Green et al. (1983a) demonstraram que a imunização induz resposta imune humoral e imunocelular (teste de proliferação "in vitro" de linfócitos sensibilizados) contra *L. major*. Em estudos envolvendo grandes contingentes das Forças Armadas de Israel, se concluiu pela proteção oferecida pela vacina, associada ao aparecimento de resposta imune protetora (revisto em Greenblatt, 1980).

USO DE PARASITAS VIRULENTOS OU NÃO NA PROTEÇÃO DA INFECÇÃO HETERÓLOGA

A idéia que orienta o uso de parasitas de uma espécie para conferir proteção contra a infecção por um agente infeccioso de espécie diferente supõe que a infecção causada pelo primeiro tenha características mais benígnas. No caso da proteção contra a leishmaniose tegumentar outros tripanosomatídeos têm sido empregados, sendo escolhidos principalmente pela similaridade biológica e pelo extenso grau de reatividade cruzada que apresentam.

As primeiras evidências da possibilidade de obter proteção cruzada são bastante antigas. Em 1910, Nicole & Manceaux avaliaram a *action vaccinante des deux virus*, e mostraram em experimentos em cães que a infecção do Calazar protegia contra o botão do Oriente. Quando tentada a imunização no sentido oposto a proteção contra o Calazar através de infecção prévia por botão do Oriente, observaram que a proteção era apenas parcial (Nicolle & Manceaux, 1910). Pouco tempo depois foi demonstrado que um macaco recuperado da infecção por *L. tropica* foi resistente à infecção por *L. donovani* (Laveran, 1914). Estes dados foram confirmados no cão (Parrot et al., 1927), parecendo indicar a possibilidade de proteção cruzada entre as leishmanias tegumentares e visceralizantes, pelo menos sob certas condições. Mesmo no homem foi mostrado que dois pacientes recuperados do botão do Oriente foram resistentes à infecção por *L. donovani*, e um outro resistente à infecção por *L. braziliensis* (Senekjic, 1943). Ressalta-se que a denominação *L. braziliensis* nesta época era empregada a todas as leishmanias tegumentares provenientes das Américas.

A extensa reatividade cruzada entre as leishmanias é hoje aceita. Em cobaias os testes de hipersensibilidade cutânea tardia podem ser realizados com antígeno preparado a partir de várias espécies de *Leishmania* (Bryceson, 1970; Neal & Miles, 1976). Pacientes recuperados de Calazar apresentam reação de Montenegro com antígenos preparados a partir de *L. braziliensis*, *L. tropica* ou *L. enriettii*. Até mesmo antígeno do *Trypanosoma cruzi* é capaz de despertar reação de hipersensibilidade cutânea tardia em pacientes leishmanióticos (Shaw & Lainson, 1975).

Pacientes infectados com *L. mexicana* apresentam respostas positivas no teste de hipersensibilidade tardia com antígeno de *L. tropica* ou de *L. mexicana* (Adler & Gunders, 1964). Reatividade cruzada entre *L. donovani* e *L. tropica* foi demonstrada em pacientes através do teste de expansão clonal de linfócitos (Wyler et al., 1979). Indivíduos vacinados com *L. major* apresentam anticorpos que reconhecem *L. donovani* (Green et al., 1983a).

Apesar da existência de reatividade imunológica cruzada não se observa uma proteção cruzada do mesmo nível. Raramente a infecção por uma espécie de *Leishmania* protege da infecção por outra, principalmente se a usada como agente sensibilizante for menos virulenta que o parasita usado na infecção desafio.

Alguns achados sugerem a ausência de imunidade cruzada entre o botão do Oriente e o Calazar (Patton, 1922). Kojevnikov (1945, citado por Guirges, 1971) relatou a observação de 86

casos de infecções repetidas, principalmente em indivíduos que migravam de uma área endêmica para outra. Outros autores soviéticos relataram que a leishmaniose causada por *L. major* protege contra a infecção por *L. tropica* (minor); mas não acontece proteção no sentido inverso (Lokolova, 1940; Rodyakin, 1957, citados por Lainson & Bray, 1966).

Pacientes que se recuperam da infecção por *L. tropica* não são imunes à infecção por *L. major* (Heyneman, 1971). Imunidade contra *L. tropica* não protege contra a *L. donovani*, assim como também não há proteção cruzada no sentido inverso (Manson-Bahr, 1961; Heyneman, 1971). No caso da leishmaniose das Américas, Lainson & Bray (1966) observaram, inicialmente em macacos, que a infecção por *L. mexicana* protegia contra a infecção por *L. braziliensis*. Quando avaliaram a proteção cruzada entre *L. mexicana* e uma espécie de *Leishmania* do Panamá (causadora de leishmaniose cutânea difusa) observaram que os indivíduos recuperados da infecção natural com esta última eram resistentes a uma infecção de prova com *L. mexicana*; porém voluntários recuperados de uma infecção induzida por *L. mexicana* eram susceptíveis à infecção pela leishmania panamense, embora fossem resistentes à outra infecção por *L. mexicana* (Lainson & Shaw, 1966). Reavaliando a imunidade cruzada, Lainson & Shaw (1977) não observaram proteção cruzada em homens ou macacos com cinco subespécies dos complexos *L. mexicana* ou *L. braziliensis*.

Contrariamente a estes dados há indicações de que *L. mexicana* ou *L. tropica* podem conferir proteção uma à outra (Perez et al., 1979). Mais ainda, Howard et al. (1982) usando uma vacina de *L. tropica* protegeram camundongos Balb/c contra a infecção por *L. braziliensis panamensis*, além de *L. mexicana mexicana* e *L. m. amazonensis*.

Adicionalmente, Alexandre & Phillips (1978 b) demonstraram, em camundongos, imunidade cruzada entre *L. tropica* e *L. mexicana*. Eles foram ainda capazes de transferir adotivamente a proteção contra a infecção desafio por *L. tropica* ou *L. mexicana* utilizando a população de células T (do baço e linfonodos) de camundongos recuperados de uma infecção por *L. tropica* (Alexander & Phillips, 1980).

A ausência de proteção cruzada mesmo na presença de uma marcante reatividade imunológica cruzada, tanto em indivíduos humanos quanto em animais de laboratório, representa um problema que merece análise. Aparentemente os testes de avaliação da resposta imune demonstram a presença de uma resposta contra antígenos parasitários que nem sempre são relevantes na proteção do hospedeiro. Pouco pro-

gresso foi feito no sentido da identificação de antígenos relevantes para o discernimento entre as respostas protetoras e não protetoras. Isto cria uma séria limitação na avaliação dos procedimentos de imunoprofilaxia. O único critério realmente indicativo de proteção é a reinfeção ou infecção desafio, o que não tem aplicação para as populações humanas.

Uma área negligenciada, apesar de logicamente atrativa, é a da proteção contra a infecção leishmaniótica através de infecção por parasitas de baixa virulência ou avirulentos para o homem. Neste caso, os parasitas usados para induzir a proteção não devem ser perigosos.

Souza (1979) utilizou formas de cultivo *Herpetomonas samuelpessoai* (um parasita não patogênico para o homem, e que havia demonstrado induzir uma proteção parcial contra o *T. cruzi*) como agente sensibilizante e demonstrou a indução de imunidade cruzada contra *L. mexicana amazonensis* em camundongos. Nesta mesma linha Terrientes & Zeledon (1980) demonstraram que a imunização com produtos das *L. hertigi* (um parasita do porco-espinho, e restrito à pele) retarda a infecção por *L. mexicana*, em grau menor à de *L. braziliensis*. Alexander & Phillips (1978b), mostraram que uma infecção concomitante pelo *Trypanosoma brucei* inibe o crescimento de *L. mexicana* ou *L. tropica*. Neste caso o uso de parasita virulento limita a possibilidade de aplicação de tal método e reduz o impacto da observação.

USO DE ORGANISMOS "ATENUADOS" OU PRODUTOS PARASITÁRIOS

O uso de organismos "atenuados" ou principalmente de produtos parasitários é uma abordagem que visa evitar os perigos e inconveniências do emprego de parasitas infectantes, sejam homólogos ou heterólogos, virulentos ou não.

Já em 1929 Parrot tentou a imunização de macacos com leishmanias mortas pelo calor, ou a imunização de camundongos através do uso de parasitas que haviam perdido a infectividade devido à longa manutenção em cultura, mas não foi bem sucedido em qualquer das tentativas.

A despeito destes insucessos a atrativa idéia de imunização através de parasitas mortos, motivou alguns investigadores brasileiros a avaliar tal abordagem na proteção contra a leishmaniose humana. Salles-Gomes (1939) relata que tentou tal imunização, porém não chegou a avaliar o seu resultado devido à dificuldades logísticas do acompanhamento dos indivíduos na área endêmica. A vacinação foi tentada novamente pelo Prof. Samuel Pessoa, em maior escala e levou a resultados que sugeriram o efeito protetor do procedimento imunizante (Pessoa & Pestana, 1940). A experiência de vacina-

ção foi então ampliada, envolvendo mais indivíduos e outras localidades; sua avaliação mostrou que o grupo de indivíduos vacinados apresentava índice de infecção menor que o grupo controle, sendo a diferença estatisticamente significativa (Pessoa, 1941a, b). Achados semelhantes foram obtidos também em macacos *Rhesus* (Pessoa & Barreto, 1945).

Alguns dados pareciam sugerir que o esquema de imunização não era completamente efetivo. Estudo realizado no Estado de São Paulo não conseguiu evidenciar a positividade da reação de Montenegro nos indivíduos vacinados segundo o esquema proposto pelo Prof. Pessoa (Curban, 1942). E Berberian (1944d) utilizando também o mesmo esquema, porém com *L. tropica*, não conseguiu a proteção dos indivíduos vacinados no Oriente Médio. Até mesmo com o uso de parasitas que haviam perdido a infectividade (após 488 repiques em meio cultivado), na Venezuela, não se observou grau significativo de conversão positiva na reação de Montenegro e na proteção contra a infecção (Salazar, 1965).

Recentemente alguns pesquisadores reiniciaram o teste com a vacina de formas mortas no Brasil. Mayrink et al. (1979) relataram o uso de vacina obtida de promastigotas de diferentes origens, avaliada em seres humanos. Três meses após o uso, a vacina foi capaz de induzir o aparecimento de respostas positivas no teste de hipersensibilidade cutânea tardia em 78% dos indivíduos vacinados, enquanto os controles não vacinados apresentavam respostas negativas. Em função do tempo pós-vacinação a positividade do teste de Montenegro mostrou uma diminuição percentual no grupo vacinado, porém pelo teste de inibição de migração de leucócitos foi possível demonstrar respostas positivas até três anos após a imunização. Neste estudo não foi possível avaliar efeito protetor do esquema de vacinação porque no período de acompanhamento não foi observado qualquer caso de leishmaniose na área, tanto no grupo vacinado quanto no controle.

Numa situação de emergência o mesmo grupo voltou a fazer uso da vacina num surto epidêmico no Espírito Santo. Apesar das condições adversas, constituídas pela grande migração populacional e pelas alterações da incidência de leishmaniose nas sub-áreas do estudo, estes investigadores observaram uma significativa proteção do grupo vacinado. Confirmaram também o significativo grau de conversão positiva da reação de Montenegro entre os indivíduos submetidos à imunoprofilaxia (Mayrink et al., 1985).

Apesar dos resultados positivos quanto à imunoproteção o desconhecimento completo dos mecanismos operativos e os riscos de se al-

terar o equilíbrio imunológico responsável pela resposta à infecção leishmaniótica, recomendam muita cautela na realização dos estudos em seres humanos. A busca de uma imunização efetiva e segura, e o conhecimento dos mecanismos operativos na imunoproteção têm determinado a ênfase no estudo de modelos animais de vacinação contra a leishmaniose. Já em 1954, Coutinho relatou a proteção de cobaias contra a infecção por *L. enriettii* com o uso de formas mortas do parasita.

Alguns autores conseguiram proteção com o uso de parasitas, ou seus produtos, em adjuvante completo de Freund, tanto em camundongos, contra *L. tropica* (Preston & Dumonde, 1976), como em cobaias, contra a *L. enriettii* (Gorczynski, 1983). A reatividade cruzada entre a *Mycobacteria* do adjuvante e a *Leishmania* levam a certa dúvida quanto à especificidade neste tipo de procedimento.

Com o objetivo de impedir a multiplicação parasitária Marva & Greenblatt (1979) trataram promastigotas de *L. tropica* com actinomicina, porém mesmo com a injeção múltipla de tal produto não obtiveram proteção em animais de experimentação.

A idéia de utilizar a irradiação na atenuação dos parasitas é antiga. Lemma & Cole (1974) usaram altas doses de raios gama na atenuação de *L. enriettii* mas observaram que o potencial imunizante desaparecia com a perda da capacidade infectante. Alexander (1982), por outro lado, observou a proteção de camundongos CBA, contra a infecção por *L. mexicana mexicana*, utilizando a imunização com promastigotas irradiadas. Vale mencionar que a proteção contra *L. mexicana mexicana* só foi conseguida com promastigotas irradiadas de *L. major*, mas não com o parasita homólogo; coincidentemente as promastigotas de *L. major* foram mais resistentes à irradiação gama que as de *L. mexicana mexicana*.

Já com o uso intradérmico de promastigotas sonicadas de *L. braziliensis panamensis* foi obtida a proteção contra a infecção homóloga em *Mystromys albicaudatus* (Beacham et al., 1982). Apesar de se tratar de animal pouco susceptível à infecção por este parasita, somente 50% dos animais desenvolveram proteção.

Abordagem interessante foi realizada por Mitchell et al. (1984) ao demonstrarem proteção com a imunização por clones avirulentos de *L. major*.

O uso de parasitas irradiados ou atenuados quimicamente ainda apresenta o perigo potencial do escape de parasitas ao tratamento, ou da sua reativação. Estes perigos são extremamente atemorizadores no caso das leishmanias das Américas, com a sua capacidade de produzir

formas graves da doença como a leishmaniose cutânea-mucosa. Com o objetivo de evitar estes perigos tem sido tentado o uso de produtos obtidos do fracionamento parasitário.

As tentativas de uso de uma fração ribossomal de *L. enriettii* como agente imunizante mostraram índices de proteção pouco encorajadores (Preston & Dumonde, 1971).

Proteção parcial da infecção dos camundongos Balb/c por *L. tropica* foi também obtida pela injeção prévia de material do congelamento-descongelamento de macrófagos infectados, utilizando a *Corynebacterium parvum* como adjuvante (Mitchell et al., 1981). Recentemente o mesmo grupo demonstrou proteção no mesmo sistema usando antígeno bruto de promastigotas (congelado-descongelado) quando empregando o *C. parvum* como adjuvante, e se aplicado por via intraperitoneal, mas não sub-cutânea (Mitchel & Handman, 1983).

O "fator excretado" de *Leishmania* também tem sido empregado como material imunizante; o que é inesperado tratando-se de uma substância com potencial imunossupressor (Londner et al., 1983). Nos dois estudos em que foi utilizado com esta finalidade o "fator excretado" só apresentou efeito protetor em condições restritas, ou na forma de complexos com anticorpos anti-*Leishmania tropica* (Handman et al., 1977) ou associado ao muramil dipeptídeo (Steinberg et al., 1984). Mesmo nestas condições induziu apenas uma proteção parcial em animais C3H, que são relativamente resistentes à infecção.

Todos estes sucessos eram, na melhor das hipóteses, parciais e desencorajavam a abordagem mais aprofundada dos modelos avaliados.

Recentemente Howard et al. (1982) obtiveram resultados positivos na proteção de camundongos Balb/c, altamente susceptíveis à infecção por *L. tropica*, com o uso de promastigotas irradiadas. Eles utilizaram parasitas homólogos e os níveis mais elevados de proteção foram obtidos com o uso da via intravenosa para administração do antígeno, sendo a via intraperitoneal de menor eficácia e a via subcutânea desprovida de efetividade. Posteriormente demonstraram que esta proteção não era conferida pelo soro (Howard et al., 1984) e que podia ser observada pela transferência de células com fenótipo $Lyt\ 1^+ 2^-$ (Liew et al., 1984). O reconhecimento da via endovenosa como importante na indução de imunidade protetora em animais altamente susceptíveis, foi das contribuições mais relevantes no campo da imunoprevenção das leishmanioses nos últimos anos.

A fim de evitar o uso de parasitas inteiros, mesmo que irradiados, o teste da imunização intravenosa contra leishmaniose tegumentar americana foi realizado com antígeno solubilizado

de promastigotas. A obtenção de níveis significantes de proteção do camundongo Balb/c, altamente susceptível à *Leishmania mexicana amazonensis*, confirmou a grande efetividade da via intravenosa. Ficou evidenciada também a possibilidade de imunização sem o uso de parasitas inteiros (Barral-Netto, 1985; Barral-Netto et al., 1987 a, b).

Um aspecto importante da imunização com antígeno solubilizado de *L. m. amazonensis* foi revelado pelo estudo histopatológico. Os camundongos, imunizados previamente, quando submetidos à infecção desafio desenvolvem lesões com características histológicas observáveis em animais de linhagem resistente. Enquanto o camundongo Balb/c usualmente apresenta lesões constituídas por grandes coleções de macrófagos, densamente parasitados, e com discreta infiltração linfocitária, os camundongos resistentes (C57BL/6 ou A/J) desenvolvem lesões com densa infiltração linfocitária e que tendem a fibrosar (Barral et al., 1983; Andrade et al., 1984a). Os camundongos resistentes apresentam ainda os aspectos de necrose fibrinoide, ao passo que a necrose caseosa é vista na leishmaniose do Balb/c não tratado (Andrade et al., 1984b). Os aspectos de densa infiltração linfocitária e áreas de necrose fibrinoide foram vistos em camundongos Balb/c imunizados (Barral-Netto, 1985; Barral-Netto et al., 1987 a).

Estes dados reforçam a idéia de que a imunização não está meramente reduzindo a carga parasitária. O procedimento leva à alteração qualitativa do padrão de resposta. Os achados, tanto no sistema de *L. major* como na *L. m. amazonensis*, evidenciam também que o camundongo Balb/c não possui uma incapacidade absoluta de responder, de maneira efetiva, contra a *Leishmania*.

Ao analisar mais profundamente os aspectos da imunização na leishmaniose tegumentar causada pela *L. major* em camundongos Balb/c, Liew et al., (1985a) observaram que a imunização pela via subcutânea torna os camundongos incapazes de responder a uma posterior imunização por via intravenosa. Mais ainda, tanto a imunização por via subcutânea quanto por intramuscular levaram a um aumento da susceptibilidade dos camundongos e facilitaram a progressão da doença. Tal efeito facilitador ocorre apesar da imunização primar para a produção de anticorpos e induzir uma resposta de hipersensibilidade cutânea tardia para antígenos de *Leishmania*. O efeito de abolir a capacidade protetora da imunização intravenosa pode ser transferido com linfócitos T com fenótipo $Lyt\ 1^+ 2^-$ e $L3T4^+$ (Liew et al., 1985b).

As evidências de dissociação entre proteção e resposta imune avaliada pelo teste de hiper-

sensibilidade cutânea tardia (HCT) na leishmaniose como analisado acima (Liew et al., 1985b), já são numerosas. Lima (1983) e Titus et al. (1984) evidenciaram que a transferência de populações celulares (Lyt $1^{+}2^{-}$, L3T4⁺), capazes de induzir a HCT levavam a uma exacerbação da doença. E por outro lado, a imunização por via intravenosa, e que confere proteção, pode levar a uma supressão da HCT (Dhaliwal et al., 1985).

Também relevante é a demonstração que a imunização por via subcutânea leva ao aparecimento de uma célula T (L3T4⁺), a qual abole o efeito protetor da imunização intravenosa. Linfócitos com tal característica parecem estar envolvidos no curso grave da infecção leishmaniótica do camundongo Balb/c, já que a sua eliminação, com soro GK1.5, determina um curso mais benigno da doença (Titus et al., 1985).

Duas visões aparentemente opostas tentam explicar a grande susceptibilidade do camundongo Balb/c à infecção por *Leishmania*. Numa delas a presença de uma potente célula supressora inibiria a ação de células T com capacidade de ativação dos macrófagos. Numa outra abordagem supõe-se que o camundongo Balb/c tem o sistema T funcionando normalmente, ou até de maneira exacerbada. Isto levaria a um grande recrutamento de macrófagos, os quais, por serem incapazes de destruir o parasita, facilitariam a sua multiplicação. No momento em que as células "supressoras" ou "facilitadoras" parecem ter fenótipo semelhante (Lyt $1^{+}2^{-}$, L3T4⁺) a controvérsia parece tender a ocorrer mais sobre palavras, que sobre mecanismos.

Handman & Goding (1985) relataram a identificação de uma estrutura glicolipídica considerada importante na adesão macrófago-leishmania, através do uso de anticorpo monoclonal. Com o isolamento de tal estrutura realizavam a imunização de camundongos, os quais ficavam resistentes à infecção por *L. major* (Handman & Mitchell, 1985). O uso de anticorpos monoclonais na proteção *in vivo* contra leishmaniose também já foi demonstrado, porém sem envolver a vacinação com as estruturas reconhecidas pelos anticorpos (Anderson et al., 1983).

Ao analisar estudos de imunização na leishmaniose duas notas de cautela são necessárias: uma decorrente do fato de que nem todos os achados obtidos com o modelo da *L. major* são transponíveis para os parasitas do complexo *L. mexicana*, já que a imuno-regulação pode ser diferente nos dois casos (Alexander & Kaye, 1985); outra é que diferentes isolados de parasitas podem variar na quantidade (ou qualidade) de antígenos indutores de uma resposta protetora pelo hospedeiro, como sugerido recentemente (Mitchell et al., 1985).

RESUMO

Imunização específica nas leishmanioses tegumentares – Revisão – Revisamos os dados da literatura concernentes à imunoproteção específica contra a leishmaniose tegumentar. Estão incluídos trabalhos envolvendo seres humanos e também os realizados com animais de experimentação. A revisão se divide em três tópicos principais: 1) Estudos que visam a proteção através do uso de parasitas virulentos da mesma espécie; 2) Uso de parasitas, virulentos ou não, na proteção contra outras espécies de *Leishmania*; 3) Uso de parasitas "atenuados" ou de produtos parasitários na proteção contra a infecção.

Palavra-chave: leishmaniose – leishmaniose tegumentar – imunização

REFERÊNCIAS

- ADLER, S. & GUNDERS, A.E., 1964. Immunity to *Leishmania mexicana* following spontaneous recovery from Oriental sore. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58 :274-277.
- ALEXANDER, J., 1982. A radioattenuated *Leishmania major* vaccine markedly increases the resistance of CBA mice to subsequent infection with *Leishmania mexicana mexicana*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76 :646-649.
- ALEXANDER, J. & KAYE, P.M., 1985. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: Different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin. exp. Immunol.* 61 :674-682.
- ALEXANDER, J. & PHILLIPS, R.S., 1978a. *Leishmania mexicana* and *L. tropica*: Inhibition of Growth in Mice by Concurrent Infections of *Trypanosoma brucei*. *Exp. Parasitol.*, 44 :136-142.
- ALEXANDER, J. & PHILLIPS, R.S., 1978b. *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana*: Cross-immunity in mice. *Exp. Parasitol.*, 45 :93-100.
- ALEXANDER, J. & PHILLIPS, R.S., 1980. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica major*: Adoptive transfer of immunity in mice. *Exp. Parasitol.*, 49 :34-40.
- ANDERSON, S.; DAVID, J.R. & McMAHON-PRATT, D., 1983. "In vivo" protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 131 :1416-1418.
- ANDRADE, Z.A.; REED, S.G.; ROTERS, S.B. & SARDIGURSKI, M., 1984a. Immunopathology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Pathol.*, 114 :137-148.
- ANDRADE, Z.A.; REED, S.G.; ROTERS, S.B. & SARDIGURSKI, M., 1984b. Patogenia da Leishmaniose cutânea experimental. A importância da necrose na eliminação dos parasitas das lesões. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 17 :187-197.
- BARRAL, A.; PETERSEN, E.A.; SACKS, D.L. & NEVA, F.A., 1983. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 :277-285.
- BARRAL-NETTO, M., 1985. Imunização de camundongos BALB/c contra a infecção por *Leishmania*

- mexicana amazonensis* utilizando promastigotas homólogas solubilizadas. Tese. Universidade Federal da Bahia.
- BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R. & ANDRADE, Z.A. 1987a. Histological changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. *Am. J. Pathol.*, 127 :271-278.
- BARRAL-NETTO, M.; REED, S.G.; SADIGURSKY, M. & SONNENFELD, G. 1987b. Specific immunization of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* using solubilized promastigotes. *Clin. exp. Immunol.*, 67 :11-19.
- BEACHAM, B.E.; ROMITO, R. & KAY, H.D., 1982. Vaccination of the African white-tailed rat, *Mysomys albicaudatus*, with sonicated *Leishmania braziliensis panamensis* promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 :252-258.
- BERBERIAN, D.A., 1939. Vaccination and immunity against Oriental sore. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 33 :87-94.
- BERBERIAN, D.A., 1955a. Cutaneous Leishmaniasis (Oriental sore) I. Time required for development of immunity after vaccination. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 49 :433-435.
- BERBERIAN, D.A., 1944b. Cutaneous Leishmaniasis (Oriental sore) II. Incubation period. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 50 :231-232.
- BERBERIAN, D.A., 1944c. Cutaneous Leishmaniasis (Oriental sore) III. Period of infectivity of saline suspensions of *Leishmania tropica* cultures kept at room temperature. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 50 :233.
- BERBERIAN, D.A., 1944d. Cutaneous Leishmaniasis (Oriental sore) IV. Vaccination against Oriental sore with suspension of killed *Leishmania tropica*. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 50 :234-236.
- BRAY, R.S.; RAHIM, G.F. & TAS-ELDIN, S., 1967. The present state of leishmaniasis in Iraq. *Helminth. Supp.*, 2 :171-186.
- BRYCESON, A.D.M., 1970. Immunological aspects of clinical leishmaniasis. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 63 :1056-1060.
- COUTINHO, J.O., 1954a. Nota sobre a imunidade adquirida na Leishmaniose da cobaia. — *Leishmania enriettii* Muniz e Medina, 1948. *Folia Clin. Biol.*, 21 (1) :15-18.
- COUTINHO, J.O., 1954b. Observações sobre a vacinação preventiva com leptomonas mortas na leishmaniose espontânea da cobaia: *Leishmania enriettii*. *Folia Clin. Biol.*, 21 (5) :321-326.
- CURBAN, G.V., 1942. Contribuição clínica ao estudo da vacinação preventiva na leishmaniose. *Rev. Paul. Med.*, 20 (5) :334-335.
- DHALIWAL, J.S.; LIEW, F.Y. & COX, F.E.G., 1985. Specific suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity in susceptible mice immunized against cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immunol.*, 49 :417-423.
- DOSTROVSKY, A., 1935. The Diagnostic Value of *Leishmania* Vaccine. *Ann. Trop. Med.*, 29 :123-128.
- DOSTROVSKY, A.; SAGHER, F. & ZUCKERMAN, A., 1952. Isophasic reaction following experimental super infection of *Leishmania tropica*. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 66 :665-675.
- GORCZYNSKI, R.M., 1983. *In vitro* analysis of immune responses of inbred guinea-pigs infected *in vivo* with *Leishmania enriettii* and an investigation of active immunization of susceptible animals. *Cell. Immunol.*, 75 :255-270.
- GREEN, M.S.; KARK, J.D.; GREENBLATT, C.L.; LONDNER, M.V.; FRANKENBURG, S. & JACOBSON, R.L., 1983a. The cellular and humoral immune response in subjects vaccinated against cutaneous leishmaniasis using *Leishmania tropica* major promastigotes. *Parasite Immunol.*, 5 :337-344.
- GREEN, M.S.; KARK, J.D.; WITZTUM, E.; GREENBLATT, C.L. & SPIRA, D.T., 1983b. Frozen stored *Leishmania tropica* vaccine: The effects of dose, route of administration and storage on the evolution of the clinical lesion. Two field trials in the Israel Defense Forces. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77 :152-159.
- GREENBLATT, C.L., 1980. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. New Developments with Human and Veterinary Vaccines. p. 259-285. Alan R. Liss, Inc, NY.
- GUIRGES, S.Y., 1971. Natural and experimental reinfection of man with Oriental sore. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 65 :197-205.
- GUNDERS, A.E.; NAGAN, L. & MICHAELI, D., 1972. Follow-up study of a vaccination programme against cutaneous leishmaniasis. I Vaccination with a 5 year -- old human stock of *L. tropica* from the Negev. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66 :235-238.
- HANDMAN, E.; EL-ON, J.; SPIRA, D.T.; ZUCKERMAN, A. & GREENBLATT, C.L., 1977. Protection of C3H mice against *L. tropica* by a non-living antigenic preparation. *J. Protozool. (Suppl)*, 24 :21A.
- HANDMAN, E. & GODING, J.W., 1985. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.*, 4 :329-336.
- HANDMAN, E. & MITCHELL, G.F., 1985. Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82 :5910-5914.
- HEYNEMAN, D., 1971. Immunology of Leishmaniasis. *Bull. W.H.O.*, 44 :499-514.
- HOWARD, J.G.; NICKLIN, S.; HALE, C. & LIEW, F.Y., 1982. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J. Immunol.*, 129 :2206-2212.
- HOWARD, J.G.; LIEW, F.Y.; HALE, C. & NICKLIN, S., 1984. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: II. Further characterization on the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes. *J. Immunol.*, 132 :450-455.
- KATZENELLENBOGEN, I., 1942. Vaccination against Jericho boil. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 36 :28-31.
- KATZENELLENBOGEN, I., 1944. Vaccination against Oriental Sore. Report of results of five hundred and fifty-five inoculations. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 50 :239-242.
- KOUFMAN, Z.; EGON, N.; GREENBLATT, C.L.; HANDMAN, E.; MONTILIO, B. & EVEN-PAZ, Z., 1978. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis in Israel. *Israel J. Med. Sci.*, 14 :218-222.
- LAINSON, R. & BRAY, R.S., 1966. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. II Cross-immunity experiments among different forms

- of american cutaneous Leishmaniasis in monkeys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60 :526-532.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1966. Studies on the immunology and serology of Leishmaniasis. III. On the cross-immunity between Panamanian cutaneous leishmaniasis and *Leishmania mexicana* infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60 :533-535.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1977. Leishmaniasis in Brazil. XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J. Trop. Med. Hyg.*, 80 :29-35.
- LAINSON, R. & STRANGWAYS-DIXON, J., 1963. *Leishmania mexicana*: The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. I. The human disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 57 :242-265.
- LAVÉLAN, A., 1914. Nouveaux faits tendant à démontrer que le kala-azar méditerranéen doit être identifié au kala-azar indien. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 158 :1060-1064.
- LAWROW, A.P. & DUBOWSKOJ, P.A., 1937. Über Schutzimpfungen gegen Hantleishmaniose. *Archiv für Schiffs. - U. Tropenhygiene*, 41 :374.
- LEMMA, A. & COLE, L., 1974. *Leishmania enriettii*: Radiation effect and evaluation of radioattenuated organisms for vaccination. *Exp. Parasitol.*, 35 :161-169.
- LIEW, F.Y.; HALE, C. & HOWARD, J.G., 1985a. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against *Leishmania major* infection. *J. Immunol.*, 135 :2095-2101.
- LIEW, F.Y.; HOWARD, D.J.G. & HALE, C., 1984. Prophylactic immunization against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves $Lyt\ 1^{+}2^{-}$ T cells that do not mediate cutaneous DTH. *J. Immunol.*, 132 :456-461.
- LIEW, F.Y.; SINGLETON, A.; CILLARI, E. & HOWARD, J.G., 1985b. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis V. Mechanism of the anti-protective blocking effect induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. *J. Immunol.*, 135 :2102-2107.
- LIMA, G.M.C.A., 1983. *Leishmania*-specific murine T cell lines and clones: Functional analysis *in vitro* and *in vivo*. Ph.D. Thesis. (Docteur ès Sciences). Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.
- LONDNER, M.V.; FRANKENBURG, S.; SLUTZKY, G.M. & GREENBLATT, C.L., 1983. Action of leishmanial excreted factor (EF) on human lymphocyte blast transformation. *Parasit. Immunol.*, 5 :249-257.
- MANSON-BAHR, P.E.C., 1961. Immunity in Kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 5 :550-555.
- MARVA, E. & GREENBLATT, C.L., 1979. Vaccination of mice with chemically attenuated *Leishmania tropica*; *J. Protozool.*, 26 :49A.
- MAUEL, J., 1982. Recent advances in the immunology of leishmanial infections (with particular reference to the problem of vaccination). *Pontificie Academiae Scientiarum Scripta Varia* 47 pp. 91-112.
- MAYRINK, W.; COSTA, C.A. da; MAGALHÃES, P. A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M.S. & WILLIAMS, P., 1979. A field trial of a vaccine against American dermal Leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73 :385-387.
- MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COSTA, C.A. da; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA-LIMA, A.; MICHALICK, M.S.M.; FERREIRA-CARVALHO, E.; BARROS, G.C.; SESSA, P.A. & ALENCAR, J.T.A. de, 1985. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the state of Espírito Santo, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 79 :259-269.
- MITCHELL, G.F.; CURTIS, J.M. & HANDMAN, E., 1981. Resistance to cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 59 :555-565.
- MITCHELL, G.F. & HANDMAN, E., 1983. *Leishmania tropica major* in mice: Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice of high genetic susceptibility. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* :11-5.
- MITCHELL, G.F.; HANDMAN, E. & SPITHILL, T. W., 1984. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of infection. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 62 :145-153.
- MITCHELL, G.F.; HANDMAN, E. & SPITHILL, 1985. Examination of variables in the vaccination of mice against cutaneous leishmaniasis using living avirulent cloned lines and killed promastigotes of *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.*, 15 :677-684.
- MONTENEGRO, J., 1926. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Arch. Derm. Syph.*, 13 :187-194.
- NADIM, A.; JAVADIAN, E.; TAHVILDAR-BIDRUNI, G. & GHORBANI, M., 1983. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.*, 76 :377-383.
- NAGGAN, L.; GUNDERS, A.E.; DIZIAN, R.; DANNON, Y.; SHIBOLET, S.; RONEN, A.; SCHNEWEISS, R. & MICHAELI, D., 1970. Ecology and Attempted control of cutaneous leishmaniasis around Jericho, in the Jordan Valley. *J. Infec. Dis.*, 121 :427-432.
- NAGGAN, L.; GUNDERS, A.E. & MICHAELI, D., 1972. Follow-up study of a vaccination program against cutaneous leishmaniasis. II. Vaccination with a recently isolated strain of *L. tropica* from Jericho. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66 :239-243.
- NEAL, R.A. & MILES, R.A., 1976. The Montenegro reaction in guinea-pig infected by *Leishmania enriettii* and the effect of antigens prepared from various *Leishmania* isolates. *J. Trop. Med. Hyg.*, 79 :32-37.
- NICOLLE, C. & MANCEAUX, L., 1910. Recherches sur le bouton d'Orient. Cultures, Reproduction expérimentale, Immunisation. *Annales de l'Institut Pasteur*, 24 :637-720.
- PARROT, L., 1929. Sur la vaccination contre le bouton d'Orient. *Compt. rend. Soc. de Biol.*, 100 :411-412.
- PARROT, L.; DONATIEN, A. & LESTOQUARD, F., 1927. Notes expérimentales sur le bouton d'Orient et sur la leishmaniose canine viscérale. *Arch. Inst. Pasteur Alger.*, 5 :120-130.
- PATTON, W.S., 1922. Some reflections on the kala-

- azar and Oriental sore problems. *Indian J. Med. Res.*, 9 :496-532.
- PÉREZ, H.; ARREDONDO, B. & MACHADO, R., 1979. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica*: Cross-immunity in C57B1/6 mice. *Exp. Parasitol.*, 48 :9-14.
- PESSOA, S.B., 1941a. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. *Rev. Paul. Med.*, 19 :106-109.
- PESSOA, S.B., 1941b. Profilaxia da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Folha Med.*, 22 :157-161.
- PESSOA, S.B. & BARRETO, M.P., 1945. Contribuição para o estudo da imunidade da leishmaniose tegumentar americana. *I. Reun. Ann. Dermat. Sifil. Bras.*, 137-151.
- PESSOA, S.B. & PESTANA, B.R., 1940. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germes mortos. *Rev. Biol. Hig.*, 10 :112-118.
- PIFANO, F., 1962. La evaluación de la leishmaniasis tegumentaria americana en el valle de Aroa, Estado Yaracuy, mediante el índice alérgico (intradermorreacción con antígeno de *Leishmania braziliensis*). *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*, 4 :25-35.
- PRESTON, P.M. & DUMONDE, D.C., 1971. Immunogenicity of a ribosomal antigen of *Leishmania enriettii*. (Laboratory meeting). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65 :18-19.
- PRESTON, P.M. & DUMONDE, D.C., 1976. Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and self-healing infection on the mouse. *Clin. exp. Immunol.*, 23 :126-138.
- SAGHER, F., 1947. *Leishmania* vaccine test in leishmaniasis of the skin (Oriental Sore). Quantitative experiments. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 55 :658-663.
- SALAZAR, V., 1965. Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis tegumentaria americana. Ensayos profilácticos mediante vacunaciones con formas leptomonas vivas de cultivos de *Leishmania brasiliensis* Vianna, 1911. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*, 5 :365-384.
- SALLES-GOMES, L. de, 1939. A intra-dermo-reação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-Med.*, 53 :1079-1087.
- SCHNUR, L.F., 1976. Preliminary report on an attempt to vaccinate Syrian hamsters against leishmaniasis using a live vaccine at low concentration. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 70 :371-373.
- SENEKJIE, H.A., 1943. Hematologic and immunologic studies on natural and induced leishmaniasis in paretics. *Am. J. Trop. Med.*, 23 :53-58.
- SENEKJIE, H.A. & BEATTIE, C.P., 1941. Artificial infection and immunization of man with cultures of *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 34 :415-419.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R., 1975. Leishmaniasis in Brazil. X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 69 :323-335.
- SOUZA, M.C.M. de, 1979. Estudo da evolução da "*Leishmania mexicana amazonensis*" em camundongos albinos e dos efeitos da "*Herpetomona samuel-pessoai*" sobre o curso clínico, histopatológico e imunológico da infecção experimental. *Rev. Pat. Trop.*, 8 :47-128.
- STEINBERGER, A.; SLUTZKY, G.M.; EL-ON, J. & GREENBLATT, C.L., 1984. *Leishmania tropica*: Protective Response in C3H Mice Vaccinated with Excreted Factor Crosslinked with the Synthetic Adjuvant, Muramyl Dipeptide. *Exp. parasitol.*, 58 :223-229.
- TERRIENTES, Z.I. & ZELEDON, R., 1980. Vacinação con *Leishmania hertigi* contra la infección posterior com *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en hamsters. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22 :213-218.
- TITUS, R.G.; CEREDIG, R.; CEROTTINI, J.C. & LOUIS, J.A., 1985. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. *J. Immunol.*, 135 (3) :2108-2114.
- TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D. & LOUIS, J.A., 1984. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell population capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*, 133 :1594-1600.
- WITZTUM, E.; GREENBLATT, C.L.; KARK, J.; SPIRA, D.T.; KOUFMAN, Z. & MICHAELI, D., 1979. Development of a storable *Leishmania tropica* vaccine: Field testing with frozen promastigotes. *Israel J. Med. Sci.*, 15 :749-753.
- WYLER, D.J.; WEINBAUM, F.I. & HERROD, H.R., 1979. Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmanial antigens. *J. Infect. Dis.*, 140 :215-221.
- ZUCKERMAN, A. & SAGHER, F., 1963. Experimental cutaneous leishmaniasis. The development of multiple cutaneous lesions following the prophylactic inoculation of living *Leishmania tropica* into a single site. *J. Invest. Dermatol.*, 40 :193-198.