



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

LARISSA PINHEIRO SILVA

**VACINOLOGIA REVERSA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL
NO MODELO EXPERIMENTAL *Mesocricetus auratus* IMUNIZADOS
COM UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DA GP63 DE *Leishmania major*.**

**GURUPI - TO
2017**



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LARISSA PINHEIRO SILVA

**VACINOLOGIA REVERSA: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL
NO MODELO EXPERIMENTAL *Mesocricetus auratus* IMUNIZADOS
COM UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DA GP63 DE *Leishmania major*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

**GURUPI - TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586v Silva, Larissa Pinheiro.
Vacinologia reversa: avaliação preliminar da resposta imunológica contra leishmaniose visceral no modelo experimental *Mesocricetus auratus* imunizados com um peptídeo sintético da gp63 de *Leishmania major*. / Larissa Pinheiro Silva. – Gurupi, TO, 2018.
65 f.
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.
Orientador: Kelvinson Fernandes Viana
1. Leishmaniose visceral. 2. Vacina. 3. Hamster. 4. Resposta imune. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-1649 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



LARISSA PINHEIRO SILVA

Vacinologia reversa: avaliação preliminar da resposta imunológica contra leishmaniose visceral no modelo experimental *Mesocricetus auratus* imunizados com um peptídeo sintético da GP63 de *Leishmania major*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 01/12/2017 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 01/12/2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana – Orientador - UFPR

Profª Drª Virginia Carla de Oliveira – Examinadora - UFT

Prof. Dr. Dênis Carlos Ribeiro Menezes – Examinador - IFTO

Gurupi (TO).
2017.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pela sabedoria adquirida e pelo impulso na busca de novos objetivos. Aos meus pais Warner e Isabel, os quais foram o alicerce da minha formação, sempre me incentivando a caminhar nos momentos de cansaço e desânimo, demonstrando seu amor incondicional.

Ao meu irmão Rogério que por mais difícil que fossem as circunstâncias, sempre me estimulou a enfrentar as barreiras da vida. À minha avó Elvira, que de forma especial e carinhosa me deu força para realizar este sonho. O meu muito obrigado ao meu melhor amigo e namorado, Mauricio, por caminhar junto comigo, me dando apoio e incentivo na busca pelos meus ideais.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante este mestrado, em especial ao meu orientador Kelvinson Fernandes Viana, por seus ensinamentos, paciência e confiança no desenvolvimento desta dissertação.

Estendo ainda meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT), pelo edital PPSUS/CNPq 2014 e apoio financeiro disponibilizado para execução do projeto de pesquisa.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários unicelulares do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença é classificada em duas formas clínicas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais grave, sendo potencialmente fatal em indivíduos não tratados. Atualmente, um dos grandes desafios encontrados nos estudos acerca da crescente urbanização da leishmaniose visceral (LV), é o desenvolvimento de vacinas com elevada eficácia para induzir proteção contra infecção por *Leishmania*. Neste contexto, o presente estudo foi elaborado de modo a se realizar uma análise preliminar de segurança e imunogenicidade de um possível candidato vacinal contra LV, constituído por um peptídeo sintético da glicoproteína gp63 de *Leishmania major* com predição para MHC de classe I, utilizando o hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental. Um total de nove animais foram distribuídos em três grupos experimentais, entre os quais: (i) grupo controle (C, n=3), que recebeu 100 µL de solução salina estéril a 0,85%; (ii) grupo inoculado com adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA, n=3) que recebeu 30 µL de Montanide, diluída em 70 µL de solução salina estéril a 0,85% e (iii) grupo imunizado com peptídeo MCH-I de *Leishmania major* e o adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA, n=3) que recebeu 30 µL do antígeno/dose, diluído em 40 µL de solução salina estéril a 0,85% e emulsionados com 30 µL do adjuvante oleoso Montanide ISA-61VG. Os inóculos foram administrados por via subcutânea em três doses com intervalos de 14 dias. Amostras de sangue, soro e fragmentos do baço foram coletados para realização de diferentes análises laboratoriais, em tempos distintos. Perfil bioquímico da função renal e hepática, quadro leucocitário, titulação de anticorpos e linfoproliferação de esplenócitos foram alvos deste trabalho. Nossos resultados revelaram que a formulação foi inócua e não tóxica para os animais, uma vez que os níveis séricos de ureia, creatinina e das enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), se mantiveram dentro dos padrões de normalidade descrito da literatura. Além disso, a formulação se mostrou capaz de induzir uma resposta humoral específica anti-*Leishmania*, através das dosagens de IgG total. Em resposta à série branca e à linfoproliferação das células do baço, foi verificado a existência de memória imunológica através do aumento significativo da população de leucócitos, bem como pela alta atividade linfoproliferativa obtida no grupo vacinal.

Palavras-chave: vacina, glicoproteína, imunogenicidade, anticorpo, linfoproliferação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by unicellular protozoa of the genus *Leishmania*. According to the World Health Organization, the disease is classified into two clinical forms: tegumentary leishmaniasis (LT) and visceral leishmaniasis (LV). LV, also known as calazar, is the most severe form, potentially fatal in untreated individuals. Actually, one of the major challenges encountered in studies of the increasing urbanization of visceral leishmaniasis (LV) is the development of highly effective vaccines to induce protection against *Leishmania* infection. In this context, the present study was elaborated in order to carry out a preliminary analysis of the safety and immunogenicity of a possible candidate vaccine against LV, constituted of a synthetic peptide of the glycoprotein gp63 of *Leishmania major* with prediction for MHC of class I, using the hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model. A total of nine animals were distributed in three experimental groups, among them: (i) control group (C, n = 3), that received 100 μ L 0.85% sterile saline solution; (ii) Montanide ISA-61VG (ISA, n = 3) adjuvant group that received 30 μ L of Montanide, diluted in 70 μ L of 0.85% sterile saline and (iii) group immunized with MCH-I peptide *Leishmania Major* and Montanide ISA-61VG adjuvant (Lm-ISA, n = 3) that received 30 μ L of the antigen/dose, diluted in 40 μ L of 0.85% sterile saline and emulsified with 30 μ L of the Montanide ISA-61VG oily adjuvant. The inocula were administered subcutaneously in three doses at 14 day intervals. Samples of blood, serum and spleen fragments were collected for different laboratory tests at different times. Biochemical profile of renal and hepatic function, leukocyte framework, antibody titration and lymphoproliferation of splenocytes were the targets of this study. Our results revealed that the formulation was innocuous and non-toxic to the animals, since serum levels of urea, creatinine and hepatic enzymes: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AF) were maintained within the patterns of normality described in the literature. In addition, the formulation was capable to induce a humoral anti-*Leishmania* specific response by total IgG dosages. In response to the white series and lymphoproliferation of spleen cells, the existence of immunological memory was verified through a significant increase in the leukocyte population, as well as the high lymphoproliferative activity obtained in the vaccine group.

Keywords: vaccine, glycoprotein, immunogenicity, antibody, lymphoproliferation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	18
2.1.1	<i>Etiologia.....</i>	18
2.1.2	<i>Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral</i>	20
2.1.3	<i>Transmissão e ciclo biológico.....</i>	21
2.2	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	23
2.3	PREVENÇÃO E CONTROLE	25
2.4	VACINOLOGIA REVERSA NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	25
2.5	MODELO EXPERIMENTAL PARA LEISHMANIOSE	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVOS GERAIS	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	DESENHO DOS PEPTÍDEOS	30
4.2	SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS	30
4.3	PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	31
4.4	ANIMAIS	31
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.6	COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	32
4.7	LEUCOGRAMA	33
4.8	BIOQUÍMICA SÉRICA.....	33
4.9	AVALIAÇÃO DA IGG-TOTAL POR ELISA	33
4.10	LINFOPROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS.....	34
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	BIOQUÍMICA CLÍNICA	37
5.2	AVALIAÇÃO DA SÉRIE BRANCA	42
5.2.1	<i>Leucograma</i>	42

5.3	SOROLOGIA ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	45
5.4	ANÁLISE LINFOPROLIFERATIVA.....	47
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ASLi	Antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i>
ASLm	Antígeno solúvel de <i>Leishmania major</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
C3b	Proteína sérica do sistema complemento
C3bi	Proteína sérica do sistema complemento inativada
CC	Cultura Controle
CE-ASLi	Cultura Estimulada com Antígeno Solúvel de <i>Leishmania infantum</i>
CE-ASLm	Cultura Estimulada com Peptídeo Sintético de <i>Leishmania major</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP	Protease Cisteína
CR1	Sítio receptor nos macrófagos
CR3	Sítio receptor nos macrófagos
D.O	Densidade óptica
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desorribonucléico
EDT	Etanoditiol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	9-Fluorenil-metiloxicarbonila
GP63	Glicoproteína de 63kDa
HIS	Histonas Nucleossômicas de <i>Leishmania infantum</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HRP	enzima peroxidase de rábano
IgG	Imunoglobulina G
ISA	Adjuvante Montanide ISA-61VG
LabVac	Laboratório de Biomoléculas e Vacinologia

Lip0	Proteína Ácida Ribossômica P0
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
MPL-TDM	Adjuvante dicorynomicolato de monosfosforil lipídico-trealose
MTT	(3-(4,5dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Tampão fosfato-salino
RIFI	Imunofluorescência indireta
RPMI	Meio para Cariótipo
SFB	Soro Fetal Bovino
SC	Subcutânea
sp	Espécie
spp.	Espécies
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TCD4+	Linfócitos T auxiliares
TCD8+	Linfócitos T citotóxicos
TFA	Ácido Trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFT	Universidade Federal do Tocantins
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VSA	Antígeno Solúvel da Vacina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referência da bioquímica sérica em hamsters para ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	39
Tabela 2 - Leucograma de hamsters do grupo controle, ISA e Lm-ISA, obtidos 6 dias após a última dose vacinal.	43
Tabela 3 - Valores de referências de análises da série branca no modelo hamster.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i> . (a) Promastigota e (b) Amastigota. (Fonte: STOCKPHOTOS; SCIENCE PHOTO LIBRARY).....	18
Figura 2 – Pacientes com Leishmaniose Visceral, apresentando um quadro de hepatoesplenomegalia e perda de peso. (Fonte: KUMAR, 2013a).	19
Figura 3 – Casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil, em 2015. (Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017a).	21
Figura 4 - Ciclo da <i>Leishmania</i> no hospedeiro mamífero e no vetor. (Fonte: Adaptado de HARHAY et al., 2011).	23
Figura 5 - (a) Administração do anestésico Clortamina® por via intraperitoneal; (b) Coleta de sangue por meio de punção intracardíaca.	33
Figura 6 - Processo de obtenção das células mononucleares do baço de hamsters para avaliação da atividade linfoproliferativa. (a) baço recém coletado dos hamsters; (b) baço em meio rpmi; (c) maceração do baço com o auxílio de um bastão de vidro; (d) transferência do sobrenadante para o tubo de ensaio; (e) centrifugação dos tubos; (f) produto obtido após centrifugação; (g) descarte do sobrenadante; (h) adição da solução de lise; (i) produto obtido após nova centrifugação; (j) ressuspensão das células com meio RPMI.....	35
Figura 7 - Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de ureia de hamsters inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de <i>L. major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativos.	38
Figura 8 - Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de creatinina de hamsters inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de <i>L. major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativos.	40
Figura 9 - Níveis séricos das enzimas AST e ALT. As dosagens dos níveis de AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) em UI/L foram efetuadas em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de <i>L. major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Os resultados estão	

expressos como média ± desvio padrão. Valores de p<0,05 foram consideradas significativos.....	41
Figura 10 - Níveis séricos de FA. As dosagens dos níveis de FA (Fofasfatase Alcalina), em UI/L foram efetuadas em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de <i>L. major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Valores de p<0,05 foram consideradas significativos.....	42
Figura 11 - Titulação de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i> nos diferentes grupos experimentais: controle (C), adjuvante montanide ISA-61VG (ISA) e peptídeo sintético de <i>L. major</i> associado ao adjuvante montanide ISA-61-VG (Lm-ISA). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão de três hamsters por grupo, através de valores de densidade óptica (D.O). P<0.05 foram considerados significativos.....	46
Figura 12 - Atividade linfoproliferativa de células mononucleares do sangue de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) obtido por ELISA após estimulação com antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> (ASLi) e peptídeo sintético de <i>L. major</i> (ASLm). Cada barra representa a média ± desvio padrão de três animais por grupo. Os resultados estão representados por valores de densidade óptica (D.O). Foram considerados significativos p<005.....	48
Diagrama 1 - Delineamento experimental utilizado para administrar as doses vacinais por via subcutânea (SC) nos diferentes grupos experimentais.....	31

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses representam um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*), que se apresentam de duas formas principais: amastigota e promastigota (HERWALDT, 1999; SANTOS et al. 2006). Surgem aproximadamente 1,5 milhões de novos casos em 98 países todos os anos, provocando de 20 mil a 40 mil mortes (OSMAN et al., 2017). Sua principal forma de transmissão é por meio da picada do flebotomíneo fêmea, conhecido popularmente como mosquito palha (GONTIJO e MELO, 2004; MICHALICK e GENARO, 2004).

Há evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais que suportam que a leishmaniose pode ser prevenida por vacinação. Estudos com pacientes que tiveram leishmaniose tegumentar (LT), uma forma menos grave da doença, demonstraram que eles adquiriram imunidade contra a LT e ainda ficaram protegidos contra a leishmaniose visceral (LV) por imunidade cruzada (KAYE e AEBISCHER, 2011; EVANS e KEDZIERSKI, 2012; ALVAR et al., 2013).

A *Leishmania* utiliza vários fatores de virulência para poder infectar as células do hospedeiro e interferir no sistema de defesa dos macrófagos. Isso permite a sua sobrevivência dentro do ambiente hostil (ácido) do fagolisossomo e dificulta a obtenção de uma resposta específica do sistema imunológico do hospedeiro (CHANG e MCGWIRE, 2002).

As macromoléculas são normalmente absorvidas pelos macrófagos por fagocitose e então transportadas para o compartimento lisossomal, onde são degradadas pelas enzimas proteolíticas. Fragmentos relevantes escapam da degradação total e são então transportados para a superfície dos macrófagos em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). O receptor dos linfócitos-T se encaixa neste complexo peptídeo-MHC, no momento da apresentação do antígeno às células-T (BASU e RAY, 2005).

Há relatos da apresentação dos antígenos de *Leishmania* por macrófagos utilizando tanto MHC de classe I, favorecendo a eliminação das células infectadas, bem como MHC de classe II, que gera resposta imunológica humoral (KIMA et al., 1997; LANG et al., 1997).

Para que uma vacina contra *Leishmania* possa funcionar, deve-se encontrar um antígeno poderoso, capaz de ativar tanto a resposta imunológica humoral, como a resposta celular. Nas últimas duas décadas, a pesquisa tem se concentrado na identificação clássica de antígenos para o desenvolvimento de vacinas (MICHALIK et al., 2016). Felizmente, as vacinas com o patógeno morto, vivo atenuado ou até mesmo vacinas de subunidade, diminuíram com êxito a incidência de muitas doenças infecciosas e aumentaram a média de expectativa de vida do homem (MORIEL et al., 2008). No entanto, décadas de experimentos mostraram que os patógenos que são susceptíveis a vacinas são aqueles que não sofrem variação antigênica e são efetivamente eliminados por resposta imunológica humoral. Em contraste, doenças que são causadas por patógenos que variam muito, como o HIV e a Influenza, e doenças que exigem respostas imunes celulares para serem controladas, como a leishmaniose, a malária e a tuberculose, ainda aguardam vacinas eficazes (RAPPUOLI e ADEREM, 2011; SEYED et al., 2016).

Os avanços concomitantes em algoritmos baseados em computador e "ômicas" como a proteômica, a transcriptômica, a genômica funcional e a biologia de sistemas ajudaram a extrair os dados do genoma e a integrá-los em conceitos de vacinas (RINAUDO et al., 2009; SEIB et al., 2009). Esta abordagem, chamada de "vacinologia reversa", começa na sequência do genoma (e não na célula) para selecionar potenciais candidatos à vacina usando *screening* computadorizado de alto rendimento (GROOT e RAPPUOLI, 2004).

A vacinologia reversa pode encontrar subunidades candidatas a serem antígenos da composição vacinal em pouquíssimo tempo, analisando todo o genoma do patógeno com métodos de análise de dados computacional, o que pelo método clássico, testando-se proteína por proteína, iria levar anos de trabalho (SEYED et al., 2016). Com isso, é possível encontrar um antígeno potente que juntamente com um adjuvante (substância que atua auxiliando no processo vacinal, potencializando o estímulo antigênico) adequado permita que uma formulação vacinal possa finalmente fornecer proteção eficiente contra a *Leishmania*.

Um dos mais abrangentes candidatos vacinais contra leishmanioses é a glicoproteína de membrana gp63. Uma protease altamente conservada, encontrada em todas as espécies de *Leishmania*. A eficácia protetora desta glicoproteína purificada foi testada em vários modelos experimentais, utilizando diferentes espécies e adjuvantes, dando origem a resultados contraditórios (RIVIER et al.,

1999). Neste sentido, o estudo de uma nova composição vacinal heteróloga, composta por peptídeos sintéticos consiste em uma estratégia, baseada em vacinologia reversa, para se incrementar a imunogenicidade e conseqüentemente os níveis de proteção contra leishmaniose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose

2.1.1 Etiologia

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas que se encontram entre as seis endemias prioritárias no mundo. São causadas por diferentes espécies de protozoários unicelulares (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) do gênero *Leishmania*, que se apresentam de duas formas principais: promastigota ou flagelada, encontrada no tubo digestivo do vetor e amastigota ou aflagelada, presente nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Figura 1) (HERWALDT, 1999; MICHALICK, 2004; SANTOS et al. 2006; HIDE et al., 2007).

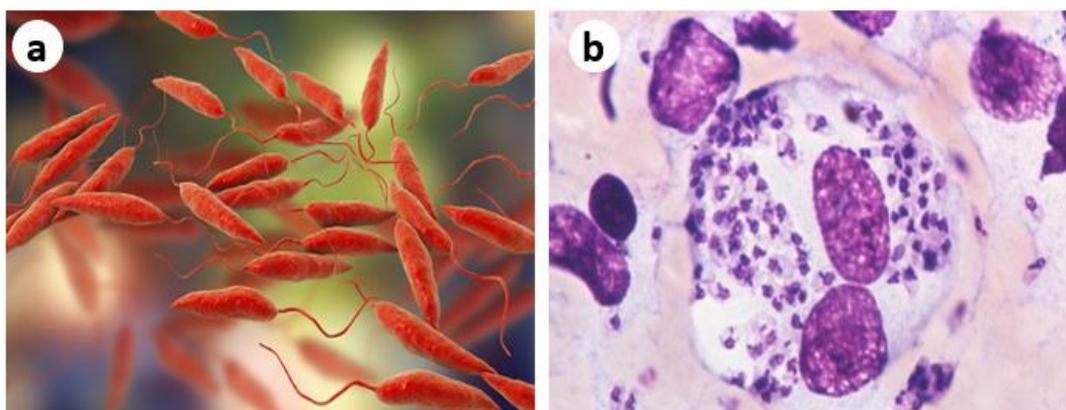


Figura 1 - Formas evolutivas do parasito *Leishmania*. (a) Promastigota e (b) Amastigota. (Fonte: DREAMSTIME; SCIENCE PHOTO LIBRARY).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) há basicamente duas formas clínicas desta enfermidade: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). A LT compreende as formas cutânea, muco cutânea e cutânea difusa da doença. Frequentemente apresenta feridas crônicas na pele e lesões cutâneas expansivas e desfigurantes caracterizadas por úlceras com bordas elevadas, infiltradas e de coloração eritematoviolácea (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). No Brasil, as principais espécies que causam a LT são

Leishmania amazonensis, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*, enquanto que no Oriente Médio, Ásia central e no Norte da África, encontram-se as espécies *Leishmania major* e *Leishmania tropica* (SHARMA e SINGH, 2008).

A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, sendo potencialmente fatal em indivíduos não tratados. Caracteriza-se principalmente por hepatoesplenomegalia, hepatomegalia, febre prolongada, anemia progressiva, perda de peso, entre outros sintomas (Figura 2) (GUERIN, 2002; DESJEUX, 2004; PISCOPO e MALLIA, 2006; WHO, 2011). Esta forma da doença é tipicamente causada por três espécies de *Leishmania*. No subcontinente indiano e na África Oriental, seu principal agente etiológico é a *Leishmania donovani*, na bacia do Mediterrâneo a *Leishmania infantum* e na América Central e do Sul a *Leishmania chagasi* (AGGARWAL et al., 1999; GARG e DUBE, 2006; SINGH, 2006; LUKES et al., 2007). Baseando-se em técnicas bioquímicas e moleculares, autores consideram que *L. infantum* e *L. chagasi* representam a mesma espécie (MAURICIO et al., 2000; GONTIJO e MELO, 2004; DANTAS-TORRES, 2006).



Figura 2 – Pacientes com Leishmaniose Visceral, apresentando um quadro de hepatoesplenomegalia e perda de peso (Fonte: KUMAR, 2013a).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

Dados epidemiológicos relatam que a LV apresenta uma incidência mundial de aproximadamente 600 mil casos novos por ano (DESJEUX, 2004; WERNECK, 2010; WHO, 2014). Deste total estima-se que 90% estejam concentrados na região da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, atingindo principalmente as populações pobres destes países (GONTIJO e MELO, 2004; MONTALVO et al., 2012).

No Brasil entre 1990 e 2015, foram confirmados 81.722 casos de LV, com média de aproximadamente 3.143 casos/ano (BRASIL, 2017a), incidência variando de 1,3 a 1,6/100.000 habitantes (BRASIL, 2017b) e letalidade de 3,2 a 7,8% (BRASIL, 2017c). Em 2015, casos autóctones da LV foram registrados em 22 dos 27 estados brasileiros (Figura 3), com a maior concentração de registros no Nordeste (1.806 casos), seguido pelo Sudeste (538 casos), Norte (469 casos), Centro-Oeste (159 casos) e Sul (5 casos) (BRASIL, 2017a).

O cenário epidemiológico estabelecido no Norte do país, se deu em grande parte pela criação do Estado do Tocantins, em 1989, onde os casos já ocorriam de forma esporádica e pela construção de Palmas, capital do Estado (LIRA, 1995), que por estar equidistante das regiões do extremo-norte, nordeste e sudeste, atraiu migrantes de todas essas localidades para ocupação em seu território, contribuindo para expansão de problemas de saúde pública, como a leishmaniose visceral, (TOCANTINS, 2012; BRASIL, 2017b).

Segundo dados do Ministério da Saúde, os coeficientes de incidência do Tocantins (12,2/100 mil habitantes) foram os mais elevados do país no período de 2001 a 2015 (BRASIL, 2017b). De acordo com um estudo realizado por PARTATA, 2010, dentre os municípios que compõem o estado, Araguaína vem obtendo o maior número de casos de LV confirmados desde 2005, sendo a maioria das notificações oriundas de bairros mais periféricos, ocupados por famílias de baixa renda que vivem sem infra-estrutura básica (RIBEIRO, 2010).

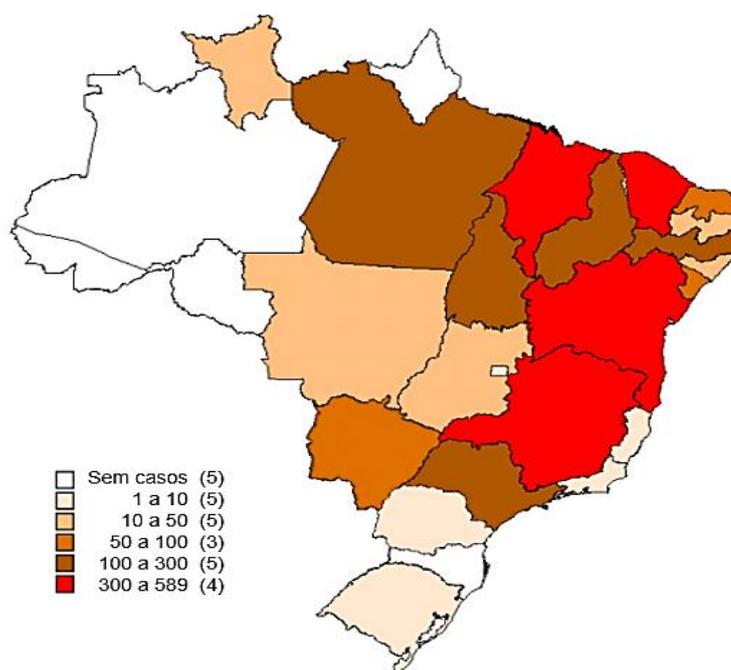


Figura 3 – Casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil, em 2015. (Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017a).

2.1.3 Transmissão e ciclo biológico

O agente causal da leishmaniose visceral é transmitido entre seus hospedeiros-reservatórios através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*), dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (GONTIJO e MELO, 2004; MICHALICK e GENARO, 2004), que ao realizarem o repasto sanguíneo inoculam formas infectantes (promastigotas metacíclicas) do parasito na pele do hospedeiro (COUTINHO et al., 2005; MONTALVO et al., 2012).

Os canídeos em geral, são considerados os principais reservatórios do parasito. No entanto, maior contribuição na transmissão da doença é observada nos cães (*Canis familiaris*), devido principalmente à sua proximidade com o homem no ambiente doméstico e acentuada carga parasitária (MICHALICK E GENARO, 2004; DANTAS-TORRES, 2006).

Um dos principais fatores de virulência envolvidos no mecanismo de infecção e sobrevivência da *Leishmania* nas células do hospedeiro é a glicoproteína de membrana gp63 (CHAUDHURI e CHANG, 1988; JOSHI et al., 2002; YAO et al., 2003; ISNARD et al., 2012). Uma protease altamente conservada, encontrada na

superfície de diferentes *Leishmania* spp., inclusive no flagelo, por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ISNARD et al., 2012).

Quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas em hospedeiros mamíferos, a gp63 evita a lise celular mediada pelo sistema complemento, inativando algumas subunidades C3b em C3bi, que se ligam à superfície do parasito e bloqueia a cascata desse sistema, impossibilitando a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). A opsonização das promastigotas pelo C3b e C3bi permitem a interação com receptores CR1 e CR3 presentes na superfície de macrófagos, que internalizam as promastigotas em vacúolos (MEDINA-ACOSTA et al., 1989; GENARO e REIS 2004; SANTOS, 2006; CALIXTO et al., 2014).

Nos vacúolos, o pH ácido, a temperatura de 37°C e a restrição de nutrientes induz a diferenciação dos promastigotas em amastigotas, que iniciam um processo de reprodução por divisão binária até romperem o macrófago infectado e serem liberadas para o meio extracelular, possibilitando assim a infecção de novas células do sistema fagocítico mononuclear (PEARSON e SOUSA, 1996; ALEXANDER et al., 1999; MICHALICK, 2002).

Quando uma nova fêmea de flebotomíneo se alimenta deste indivíduo infectado, ingere macrófagos contendo formas amastigotas que são então liberadas no intestino do vetor. Neste, o pH básico e a temperatura de 25°C induz a transformação das amastigotas para promastigotas procíclicas, sua forma replicativa. Essas formas se multiplicam por divisão binária e passam por um processo denominado metaciclogênese, ou seja, deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). Por fim, as promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto, local onde são transmitidas, dando, assim, continuidade no ciclo (Figura 4) (ALEXANDER et al., 1999; MICHALICK, 2002; GONTIJO e CARVALHO, 2003; PIMENTA et al., 2012; OLIVIER et al., 2012).

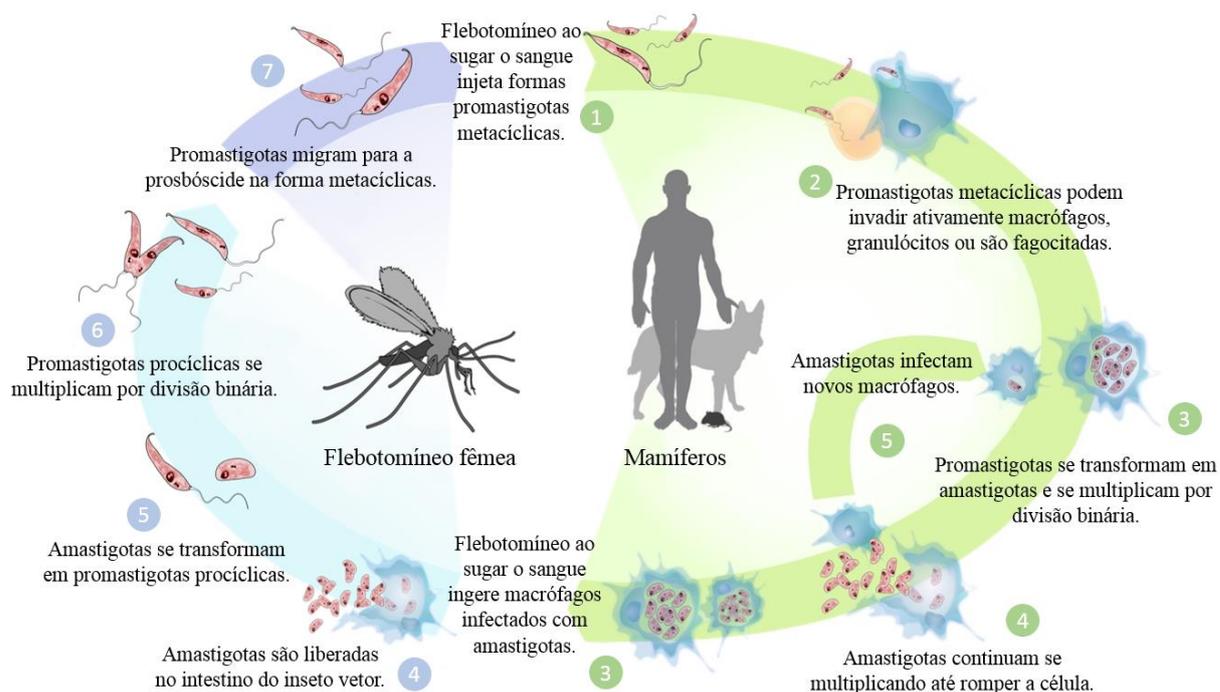


Figura 4 - Ciclo da *Leishmania* no hospedeiro mamífero e no vetor (Fonte: Adaptado de HARHAY et al., 2011).

Paralelo à estratégia de escape para sobrevivência do parasito está a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro, que de maneira geral é caracterizada pela ativação de células T (TCD4+ ou TCD8+) por meio da apresentação de antígenos via MHC (BARRAL-NETO et al., 1992; REIS et al., 2006). Há relatos da apresentação dos antígenos de *Leishmania* por macrófagos utilizando tanto MHC de classe I, favorecendo a eliminação das células infectadas, bem como MHC de classe II, que gera resposta imunológica humoral (KIMA et al., 1997; LANG et al., 1997).

2.2 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

Apesar de todos os avanços, o diagnóstico de LV continua sendo um grande desafio, especialmente em regiões endêmicas e pobres, onde os métodos de diagnóstico disponíveis geralmente são limitados (SUNDAR e RAI, 2002; SAVOIA, 2015; SAKKAS et al., 2016).

De acordo com a literatura, atualmente existem diferentes metodologias disponíveis para o diagnóstico de LV, contudo, nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Nos casos humanos, o diagnóstico é usualmente

baseado em parâmetros clínicos e epidemiológicos, associados aos métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, pois frequentemente, os sinais e sintomas da leishmaniose visceral são inconclusivos e podem ser confundidos com outras doenças como malária, doença de chagas, entre outras (ABASS et al., 2015).

O diagnóstico parasitológico é considerado o padrão confiável no diagnóstico de LV, devido à sua alta especificidade. É feito pela visualização do parasito em material de biópsia ou punção de medula óssea e vísceras (baço e fígado), isolamento da forma promastigota em culturas ou com ensaios moleculares. No entanto, por ser invasivo, pode trazer riscos ao paciente e consumir muito tempo (SRIVIDYA et al., 2012; ELMAHALLAWY et al., 2014; GHOSH et al., 2016).

Como escape de um procedimento invasivo, a sorologia também pode ser bastante útil no diagnóstico da LV, uma doença caracterizada por alta produção de anticorpos. No Brasil, os testes mais utilizados e recomendados pelo Ministério da Saúde são: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que apresenta baixa especificidade e alto índice de reações cruzadas, e o ensaio imunoenzimático (ELISA) sendo este o teste de maior escolha por ser rápido, de fácil execução e altamente sensível, permitindo assim, a detecção de baixos títulos de anticorpos (MOODY e CHIODINI, 2000; CHAPPUIS et al., 2007; SILVA, 2007; FERREIRA, 2011; MAIA et al., 2012; SRIVIDYA et al., 2012; ELMAHALLAWY et al., 2014; READY, 2014; SAVOIA, 2015).

Nos estudos com LV, as técnicas de diagnóstico moleculares tornaram-se cada vez mais relevantes devido à notável sensibilidade, especificidade, possuir várias opções de amostras a serem utilizadas e também, devido às limitações que geralmente são encontradas nos métodos convencionais parasitológicos e sorológicos (SRIVIDYA et al., 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Comumente são feitas por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), o qual permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito, e por Western Blot (WB), técnica usada para identificar proteínas em uma mistura de extratos celulares. Essas técnicas são utilizadas com sucesso para detectar infecção assintomática por *Leishmania* e para diagnosticar e acompanhar pacientes com LV (FUKUTANI et al., 2014). No entanto, a implementação de métodos moleculares é muitas vezes difícil, especialmente nos países em desenvolvimento, porque eles são caros, precisam de laboratórios bem equipados, além de pessoal bem treinado e qualificado (SAKKAS et al., 2016).

2.3 Prevenção e controle

Medidas preventivas que podem ser tomadas são dirigidas a população, ao vetor, e aos cães. A prevenção individual deve ser feita evitando-se o contato do indivíduo com os insetos transmissores por meio da utilização de repelentes, enquanto a prevenção coletiva é feita com métodos que impeçam o acesso dos vetores contaminados aos ambientes em que tenha a circulação de pessoas. O método de prevenção contra o vetor baseia-se no manejo do meio ambiente, limpando praças, terrenos e quintais, além da aplicação do inseticida. Os cães podem ser protegidos por meio da vacinação, cuja a comercialização foi aprovada pelo ministério da agricultura. No entanto, não existe nenhum estudo que demonstre a redução do risco de infecção de humanos relacionada a vacinação canina, portanto, o seu uso fica restrito a proteção individual dos cães, sem se poder negligenciar da prevenção, mantendo a limpeza e adequação dos ambientes caninos e evitando o acesso de mosquitos a esses lugares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O controle da leishmaniose visceral no Brasil tem sido feito basicamente por meio de três medidas: O tratamento de humanos infectados, eutanásia dos animais soropositivos e a redução dos vetores por meio da aplicação de inseticida nas áreas endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; BORGES et al., 2008; SAVOIA, 2015).

2.4 Vacinologia reversa no desenvolvimento de vacinas

As abordagens para produção de vacinas fizeram grandes progressos desde os séculos XVIII e XIX, quando Louis Pasteur propôs que para fazer uma vacina, deveria “isolar, inativar e injetar o microorganismo”. No entanto, com a evolução da tecnologia em informática, as pesquisas em vacinas foram tomando rumo diferente e ultrapassaram as regras de Pasteur, reduzindo o custo financeiro e o tempo de identificação de novos antígenos candidatos. Essa estratégia foi denominada vacinologia reversa (ADU-BOBIE et al., 2003; LILJEROOS et al., 2015; RAPPUOLI, 2000).

O uso da vacinologia reversa por meio da bioinformática se mostrou indispensável para desenvolver vacinas universais contra agentes patogênicos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da hepatite C, a gripe e a

Leishmania, para os quais as abordagens tradicionais não obtiveram êxito (RAPPUOLI et al., 2011; NABEL, 2013).

O objetivo principal da vacinologia reversa é rastrear *in silico* novos imunogênicos que sejam capazes de induzir imunidade ao hospedeiro, quando reconhecidos pelos linfócitos T. Na prática, isso requer engenharia estrutural dos epítopos neutralizantes e uma leitura quantitativa da resposta imune induzida pela vacina. Portanto, as ferramentas computacionais (SYFPEITHI, TriTrypDB, IEDB, NETMHC, SVMHC, entre outros) que podem facilitar essas duas áreas cumpriram papéis cada vez mais importantes na vacinologia reversa nos últimos anos (HE e ZHU, 2015).

A vacinologia reversa levou a um interesse em vacinas de subunidades utilizando uma única proteína como antígeno (THOMPSON e STAATS, 2011). Seguindo esse raciocínio, se uma única proteína é capaz de gerar uma resposta imunológica, e ela é composta por vários epítopos, dos quais, alguns são completamente desnecessários, podendo até prejudicar a imunogenicidade, criou-se um interesse em "vacinas de peptídeos" contendo apenas os epítopos capazes de induzir as respostas imunológicas desejadas (SESARDIC, 1993; LI et al., 2014).

Os "peptídeos" utilizados nestas vacinas possuem uma sequência de 20 a 30 aminoácidos que são sintetizados de modo a representarem o epítipo específico da proteína capaz de gerar resposta imune. Como os epítopos são os determinantes antigênicos dentro de proteínas maiores, esses peptídeos são a sequência capaz de gerar memória imunológica (LIN et al., 2013), ao mesmo tempo em que eliminam a chance de gerar respostas alérgicas e/ou reações. Além disso, as vacinas peptídicas podem ser utilizadas para induzir ampla imunidade contra variantes sorológicas múltiplas (sorotipos) ou estirpes de um dado patógeno. Para isso, deve-se formular múltiplos epítopos imunogênicos e/ou epítopos conservados entre diferentes sorotipos/estirpes de um patógeno. Contudo, deve-se levar em consideração que o tamanho relativamente pequeno dos peptídeos, muitas vezes não são imunogênicos e requerem o uso de adjuvantes para a indução de uma robusta resposta imune (AGUILAR e RODRÍGUEZ, 2007).

A identificação, seleção e construção do(s) epítipo(s) candidato(s) ou antígeno(s) da vacina peptídica é seguida pela síntese química dos peptídeos. Os peptídeos sintetizados são subsequentemente conjugados com moléculas carreadoras ou adjuvantes, conforme a necessidade. Os testes imunológicos da

composição vacinal resultante são conduzidos “*in vitro*” e em modelos animais adequados para a determinação da segurança e eficácia, seguido então de ensaios pré-clínicos e clínicos (LI et al., 2014; YANG e KIM, 2015). A fabricação de vacinas peptídicas é considerada segura e econômica quando comparada às vacinas convencionais (LI et al., 2014)

A seleção do adjuvante mais apropriado para cada vacina, deve ser baseada na espécie a ser vacinada, na via de administração e na resposta imune desejada (humoral ou celular). São exemplos de adjuvantes: sais de alumínio, únicos a serem aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em vacinas humana, emulsões de óleos, micobactérias, saponinas, lipossomas, entre outros (OGRA et al., 2001; MOTA et al., 2006; DUMMER et al., 2014). Na classe de emulsões, está incluído o Montanide® ISA61VG, um adjuvante à base de óleo, desenvolvido pela SEPPIC, adequado para antígenos com imunogenicidade relativamente baixa. De acordo com o fabricante, trata-se de uma emulsão de baixa viscosidade, capaz de induzir uma proteção forte e duradoura. Seu mecanismo de ativação envolve a formação de um depósito do antígeno no local da injeção, atraindo as APCs para o local da inflamação (SILVA et al., 2015; SEPPIC, 2017).

2.5 Modelo experimental para leishmaniose

Nos estudos da leishmaniose, espera-se que o modelo animal utilizado desenvolva respostas patológicas e imunológicas semelhantes a doença em humanos, quando expostos a uma variedade de *Leishmania* spp. (KUMAR, 2013b).

Para seguir as normas legais e técnicas determinadas pela portaria do Ministério da Saúde, os estudos preliminares (Fase I) de segurança, eficácia e imunogenicidade devem ser conduzidos inicialmente em animais de laboratório, como camundongos e hamsters, para então serem conduzidos na espécie alvo como o cão e o homem (BRASIL, 2005). Modelos experimentais como o hamster dourado (testes primários) e o cão (testes secundários) geralmente são os mais utilizados em estudos vacinais contra leishmaniose visceral (KUMAR, 2013b).

Apesar da limitação dos estudos imunológicos no modelo hamster, devido à escassez de reagentes específicos (como anticorpos, marcadores celulares e citocinas), ainda assim este modelo tem sido a preferência nos estudos de leishmaniose, principalmente por serem de baixo custo, fácil manipulação e manutenção, e apresentarem características da LV humana e canina ativa, como

caquexia progressiva, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, aumento implacável da carga de parasitos viscerais, titulação elevada de anticorpos, ausência de resposta linfoproliferativa e por fim, morte (MELBY et al., 2001; LORÍA-CERVERA e ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Realizar um estudo preliminar de segurança e imunogenicidade de um possível candidato vacinal contra LV, constituído de um peptídeo sintético da gp63 de *Leishmania major* com afinidade para MHC de classe I.

3.2 Objetivos Específicos

- i) Avaliar o grau de inocuidade e toxicidade da formulação vacinal proposta, através da bioquímica sérica do sangue de hamsters *Mesocricetus auratus*.
- ii) Avaliar a capacidade da vacina de induzir uma resposta imune, por meio da avaliação dos parâmetros leucocitários, níveis de IgG-total e atividade linfoproliferativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Biotério e Laboratório de Biomoléculas e Vacinologia (LabVac) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) - câmpus de Gurupi, em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidade Estadual Paulista (Unesp) de Araraquara.

4.1 Desenho dos peptídeos

O epítipo de gp63 de *Leishmania major* com predição ao MHC de classe I foi identificado através do *software* SYFPEITHI, um programa de livre acesso na *World Wide Web* que possui um banco de dados com mais de 7000 sequências de peptídeos. Devido a possibilidade do depósito de patente, a sequência de aminoácidos do peptídeo foi omitida.

4.2 Síntese química dos peptídeos

A síntese do peptídeo foi feita utilizando o método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), de acordo com o protocolo padrão (MERRIFIELD, 1963). O procedimento foi realizado utilizando as estratégias base-lábil 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupo amino, derivados do t-butílicos como protetor das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais e Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, tanto para Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, foi utilizado um excesso molar de três vezes quando comparado com a quantidade de resina inicial. Após o acoplamento, utilizou-se uma solução de 20% (v/v) de piperidina em DMF afim de remover o grupo base-lábil Fmoc.

Através do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970), foi monitorada a eficiência das etapas de acoplamento e desproteção, considerando que quando detectado a presença de grupos amino livre (positivo), repetiu-se o processo utilizando 50% da concentração inicial dos reagentes.

A remoção do grupo base-lábil Fmoc e a clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas, foram realizadas a partir do tratamento destas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,0%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS

(1,0%), à 25°C por 2 horas. O peptídeo obtido após a clivagem foi precipitado e lavado com éter dietílico gelado. Em seguida foi retido em um funil de placa porosa para ser eluído em água, e só então foi liofilizado. Após sua liofilização uma parte da massa do extrato bruto foi dissolvida em solvente A (água + TFA 0,04%), até que o material se solubilizasse por completo. A solução resultante foi analisada qualitativamente utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa e gradiente de acetonitrila (5 a 95%).

4.3 Purificação e identificação dos peptídeos

A purificação do peptídeo foi realizada utilizando cromatografia líquida de baixa pressão em coluna de fase reversa e gradiente de acetonitrila (5 a 95%). Após esse procedimento as frações obtidas foram analisadas por CLAE. O conteúdo contido no tubo com o peptídeo foi unido e liofilizado para uma posterior análise por CLAE, afim de confirmar sua pureza. A caracterização do peptídeo após purificação foi realizada empregando espectrometria de massa.

4.4 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 9 hamster (*Mesocricetus auratus*) de ambos os sexos, com idade de 4-8 semanas. Os animais foram criados no biotério da Universidade Federal do Tocantins, mantidos em caixas de plásticos revestidas com maravalha autoclavada e submetidos a um manejo sanitário rigoroso, com água potável e ração comercial em quantidades suficientes.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), com protocolo nº 288/2013 (Anexo I).

4.5 Delineamento experimental

No Diagrama 1 encontra-se o delineamento experimental realizado neste trabalho. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: um grupo inoculado com o adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA, $n=3$), onde cada animal recebeu 30 μ L do adjuvante oleoso Montanide ISA-61VG diluído em 70 μ L de solução salina 0,85%, o segundo grupo inoculado com o peptídeo associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA, $n=3$) onde os animais foram imunizados com 30 μ L do peptídeo MHC-I de *L. major* diluído em 40 μ L de solução salina 0,85% e emulsionados com 30 μ L do adjuvante oleoso Montanide ISA-61VG, além do

grupo controle (C, $n=3$) onde foi administrado em cada animal 100 μL de solução salina estéril a 0,85%.

A inoculação nos diferentes grupos experimentais foi administrada por via subcutânea em três doses com intervalos de 14 dias. Após 6 dias da última dose aplicada foi realizada a coleta de sangue de todos os animais.

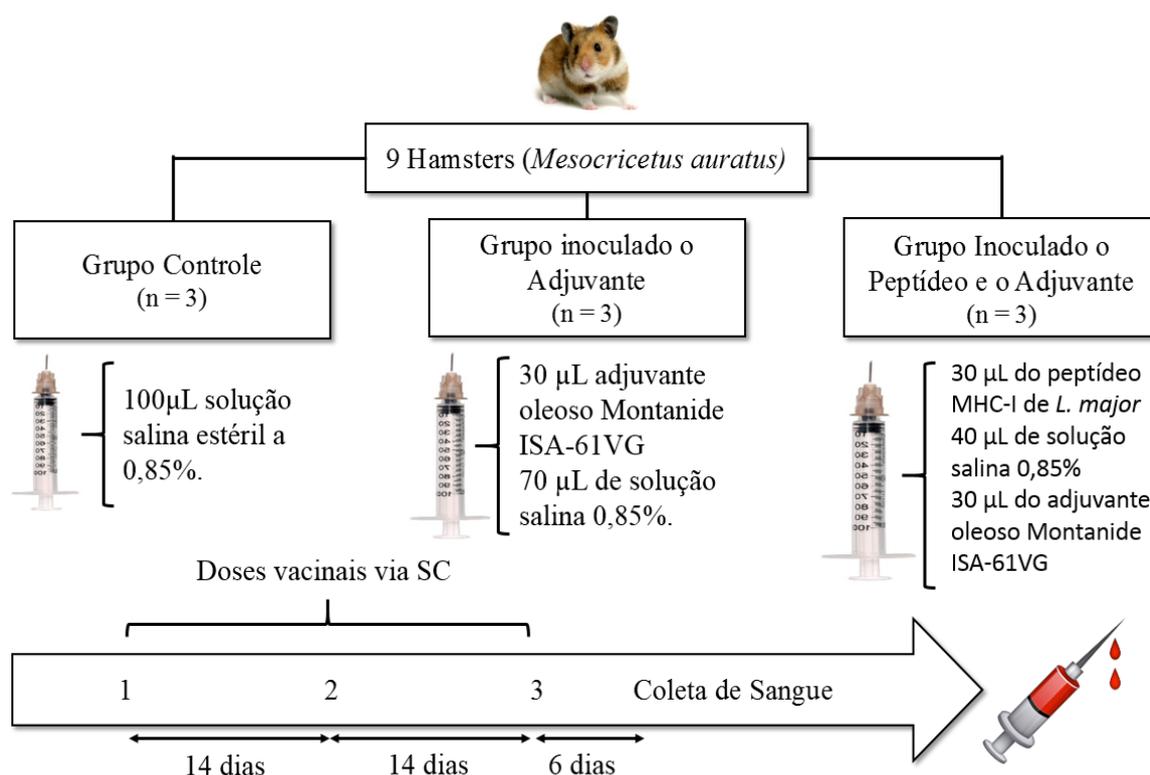


Diagrama 1- Delineamento experimental utilizado para administrar as doses vacinais por via subcutânea (SC) nos diferentes grupos experimentais.

4.6 Coleta de amostras de sangue

A coleta foi realizada após administração de 0,2 mg/kg do anestésico Clortamina® (50mg/mL) por via intraperitoneal (Figura 5A). As amostras de sangue foram coletadas com o auxílio de seringas de insulina de 1mL estéreis, por meio de punção intracárdica de 500 μL de sangue (Figura 5B). Do volume total de sangue coletado, 50 μL foram destinados às avaliações hematológicas, 10 μL enviados à confecção dos esfregaços sanguíneos em lâminas para contagem diferencial de células e 440 μL destinados à centrifugação (2000rpm durante 10 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizado para realização dos testes sorológicos e dosagens bioquímicas.

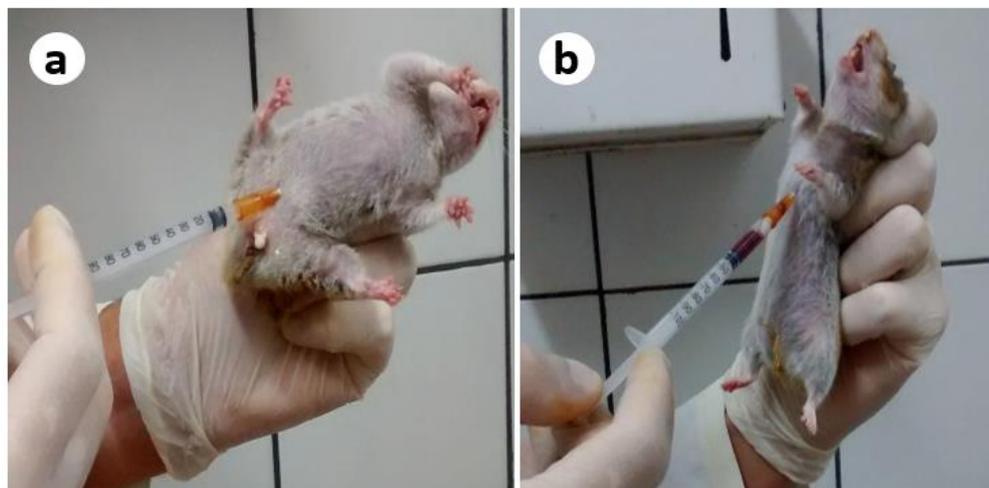


Figura 5 - (a) Administração do anestésico Clortamina® por via intraperitoneal; (b) Coleta de sangue por meio de punção intracardíaca.

4.7 Bioquímica sérica

Todas as determinações da bioquímica sérica (ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA)) foram realizadas utilizando o Sistema Bioquímico Automático (CELMBSA-200, Barueri, SP, Brasil) e Kits comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), adotando o modelo apresentado pelo fabricante.

4.8 Leucograma

A contagem total das células foi realizada através do aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha), o qual permitiu a análise global de leucócitos/mm³. Para a contagem diferencial de células utilizou-se microscopia óptica em objetiva de imersão com uma lâmina contendo uma fração sanguínea que foi submetida a esfregaço e então corada com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®). Neste contexto, foi determinado o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

4.9 Avaliação da IgG-total por ELISA

A sorologia anti-*Leishmania* foi feita por meio de reações imunoenzimáticas de ELISA, de acordo com o protocolo de MOREIRA e colaboradores, (2012a). A

princípio, 18 poços de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com 3µL do antígeno solúvel de *L. major* (SLiA) em 97µL de solução de cobertura e em seguida incubadas over-night. O excesso do antígeno foi removido da placa através de sucessivas lavagens (4x) com solução de lavagem (solução salina contendo PBS-Tween 20). Posteriormente, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas aplicando 100µL/poço de uma solução contendo PBS com soro fetal bovino (SFB) 5%. Em seguida, a placa bloqueada foi deixada em uma estufa a 37°C por 45 minutos. Decorrido esse tempo, seguiu-se para lavagem, conforme descrito anteriormente. Os soros, em triplicata e na diluição de 1:40 (1µL de soro + 40µL PBS-Tween), foram aplicados às placas em um volume de 100µL/poço e incubados a 37°C por 45 minutos. Após o período de incubação, a placa foi novamente lavada 4x e o conjugado (com HRP) aplicado na concentração de 1:3000. Cada poço recebeu 100µL da solução.

A seguir, a placa foi incubada ao abrigo da luz, por 45 minutos a 37°C seguida de nova lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100µL/poço do substrato TMB, mantendo-se a 37°C, por 20 minutos. Após o término, foi adicionado 32µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,5M para interromper a reação. As leituras foram realizadas em um leitor de ELISA automático (POLARIS) a 490nm e os resultados expressos em valor de densidade óptica (D.O).

4.10 Linfoproliferação de esplenócitos

Decorrido 211 dias da última dose vacinal, todos os hamsters foram eutanasiados. Como procedimento de eutanásia, foi realizada a administração de uma dose letal (0,5µl) do anestésico Clortamina via intracardíaca. Logo após a comprovação da morte do animal, os mesmos foram colocados em álcool 70% e os procedimentos de obtenção do material biológico foi iniciado. Dentro da capela de fluxo laminar, os baços foram coletados assepticamente e colocados de forma separada em provetas de 5mL estéreis, contendo 500µL de meio RPMI. Em seguida, com o auxílio de um bastão de vidro, os baços foram macerados e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 4mL de meio RPMI, que seguiram para centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos. Após o término, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foi adicionado 5mL do tampão de lise 1x, homogeneizando em intervalos de 3 minutos, por 10 minutos, até completa dissolução do *pélllet*. Os tubos foram novamente centrifugados a 1200 rpm durante 8

minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Para ressuspender as células, foi adicionado 1mL de meio RPMI e a solução mais uma vez homogeneizada (Figura 6).

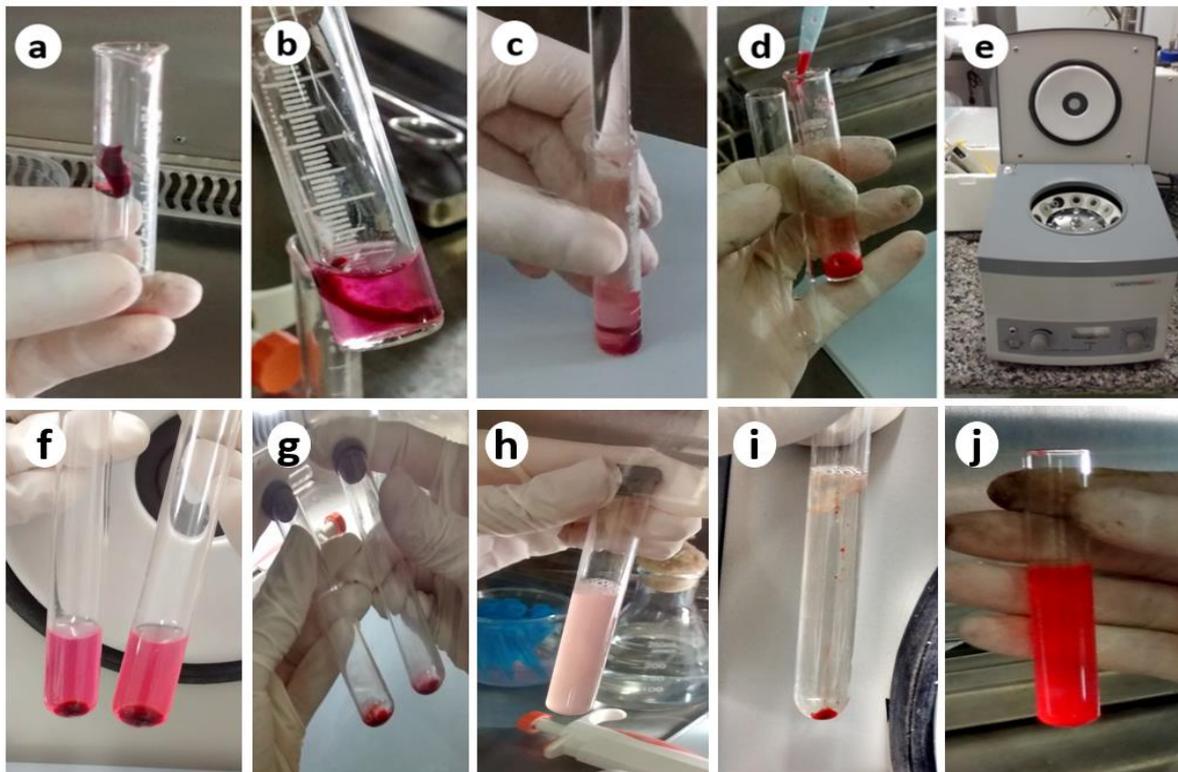


Figura 6 - Processo de obtenção das células mononucleares do baço de hamsters para avaliação da atividade linfoproliferativa. (a) baço recém coletado dos hamsters; (b) baço em meio rpm; (c) maceração do baço com o auxílio de um bastão de vidro; (d) transferência do sobrenadante para o tubo de ensaio; (e) centrifugação dos tubos; (f) produto obtido após centrifugação; (g) descarte do sobrenadante; (h) adição da solução de lise; (i) produto obtido após nova centrifugação; (j) ressuspensão das células com meio RPMI.

Para o plaqueamento foram utilizadas duas placas de 96 poços com volume de 200 μ L/poço. A primeira placa (controle), todos os poços receberam 50 μ L de células de cada animal e 150 μ L de meio RPMI, em triplicata. Já na segunda placa foi adicionado aos poços 50 μ L de células com 1 μ L do peptídeo sintético de *L. major* e 50 μ L de células com 1 μ L do antígeno solúvel de *L. infantum*, completando o volume de 200 μ L com meio RPMI. Para as amostras do grupo vacinal o procedimento foi realizado em duplicata. Seguido ao plaqueamento, as placas foram cobertas com plástico filme PVC e incubada durante 72 horas a 36°C. Decorrido este tempo, cada poço recebeu 20 μ L de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) à 5mg/mL, mantendo-se a 36°C por mais 4 horas. Após este período o

sobrenadante de cada poço foi aspirado cuidadosamente, permanecendo no fundo pequenos cristais de formazan, que foram dissolvidos com isopropanol ácido por meio da homogeneização com pipeta. A leitura das absorvâncias foi realizada utilizando um leitor automático de ELISA (POLARIS), a 540nm.

4.11 Análise estatística

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e teste de *Tukey*, com o intuito de determinar as diferenças específicas entre os grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos 30 anos, a leishmaniose visceral (LV) tem se expandido principalmente para áreas urbanas e periurbanas, onde a maioria da população se encontra em situação de pobreza (DESJEUX, 2004). Diante desta problemática, estudos vêm sendo realizados com o intuito de identificar antígenos que sejam capazes de gerar uma resposta imunológica e assim serem utilizados em diferentes formulações vacinais contra LV (PEREIRA, 2013). Para isso, a escolha por análises *in silico* tem sido a preferência de muitos pesquisadores, pois fornecem ferramentas que permitem o conhecimento de genomas variados e predição de epítomos específicos, poupando ensaios desnecessários com antígenos não-imunogênicos (MARITZ-OLIVER et al., 2012).

No desenvolvimento de vacinas, além da descoberta de bons candidatos, a avaliação sistemática em modelo murino, não isogênicos, são de suma importância para tentar produzir vacinas seguras e eficazes (RAMIRO, et al., 2003; RAFATI, et al., 2005; RODRIGUEZ-CORTES, et al., 2007; BORJA-CABRERA, et al., 2008; MAROLI, et al., 2010).

Na literatura ainda é escassa as informações que dizem respeito à mensuração de parâmetros bioquímicos e leucocitários no modelo experimental hamster. Interessantemente, na leishmaniose visceral, seja humana ou canina, o acompanhamento destes parâmetros, juntamente com testes sorológicos podem fornecer subsídio para o diagnóstico e prognóstico da evolução do quadro clínico da doença (MOREIRA, 2008).

Sua interpretação adequada está relacionada com a utilização de valores de referência de acordo com o modelo adotado. Grandes variações em seus valores podem ser resultantes de lesão celular ou disfunção orgânica, refletindo assim o extravasamento de constituintes celulares para o plasma sanguíneo. Além disso, fatores como a padronização laboratorial devem ser levados em consideração (THRALL, 2007; MOREIRA, 2008; NETO et al., 2011).

5.1 Bioquímica clínica

Em uma primeira abordagem foi avaliado os parâmetros bioquímicos, comumente utilizados para análise de função renal e hepática. A análise da função

renal consiste principalmente, na determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina. A ureia, o principal produto do metabolismo proteico, é sintetizada no fígado, liberada na corrente sanguínea e filtrada pelos rins, sendo assim, eliminada principalmente pela urina (LOPES et al., 1996; MOREIRA, 2012b).

As médias e desvio-padrão dos níveis de ureia estão expressos na Figura 7. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle ($46,99 \pm 4,7$ mg/dL), ISA ($52,54 \pm 8,4$ mg/dL) e Lm-ISA ($46,85 \pm 6,4$ mg/dL), contudo todos os animais apresentaram níveis séricos acima dos limites de referência sumarizados na Tabela 1. Valores que se aproximam aos obtidos por MOREIRA et al., (2016) ao realizar a bioquímica sérica de hamsters não infectados (35-55mg/dL).

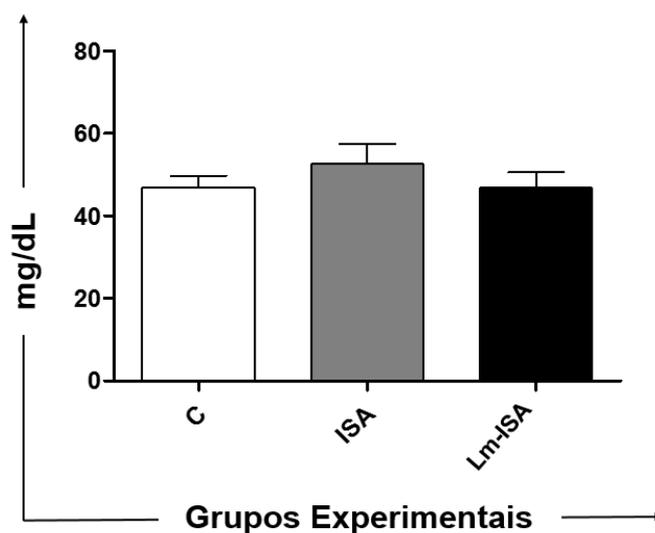


Figura 7 - Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de ureia de hamsters inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativos.

Tabela 1 - Valores de referência da bioquímica sérica em hamsters para ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Parâmetros	Valor
Ureia (mg/dL)	12-26
Creatinina (mg/dL)	0,4-1,0
FA (UI/L)	50-186
AST (UI/L)	20-150
ALT (UI/L)	20-128

Fonte: CARPENTER, 2005; SUCKOW et al., 2012.

Níveis aumentados de ureia geralmente são indicativos de insuficiência renal, decorrente de algum tipo de lesão (glomerular, tubular, intersticial ou vascular) (DUNCAN et al, 1994; STOCKHAM e SCOTT, 2002; WILLARD e TVEDTEN, 2012). Porém, quando analisada isoladamente, não é considerada um bom indicador do funcionamento renal, visto que sua concentração é afetada por fatores extra-renais como ingestão proteica elevada, jejum prolongado e até mesmo problemas hepáticos. Devido a essas interferências, a dosagem de outras substâncias, tais como a creatinina, devem ser levadas em consideração para melhor avaliação da função renal (TOMPSON e WARDROP, 1987; LOPES et al., 1996; STOCKHAM e SCOTT, 2002).

Os níveis plasmáticos de creatinina, são proporcionais à massa corporal e não são afetados pela dieta nem pelo catabolismo proteico. Sua eliminação ocorre pelos glomérulos, sem reabsorção tubular ou reaproveitamento pelo organismo, características que a torna mais confiável na avaliação clínica da filtração glomerular, de forma que uma alta concentração sanguínea desta substância é indicativa de deficiência na funcionalidade renal (LOPES et al., 1996; TENNANT, 1997).

No presente estudo, a dosagem de creatinina encontrada nos hamsters do grupo controle foi de $0,45 \pm 0,09$ mg/dL, no grupo ISA $0,52 \pm 0,04$ mg/dL e no grupo Lm-ISA $0,47 \pm 0,04$ mg/dL (Figura 8). Diante dos resultados, nota-se que não houve diferenças significativas entres os grupos, além de estarem todos dentro do intervalo de normalidade descrito por CARPENTER, (2005) e SUCHOW et al., (2012). Seus baixos níveis se justificam pelo fato dessa substância ser quase que totalmente

eliminada durante uma filtração glomerular normal, sugerindo que os inóculos não apresentaram toxicidade aos animais.

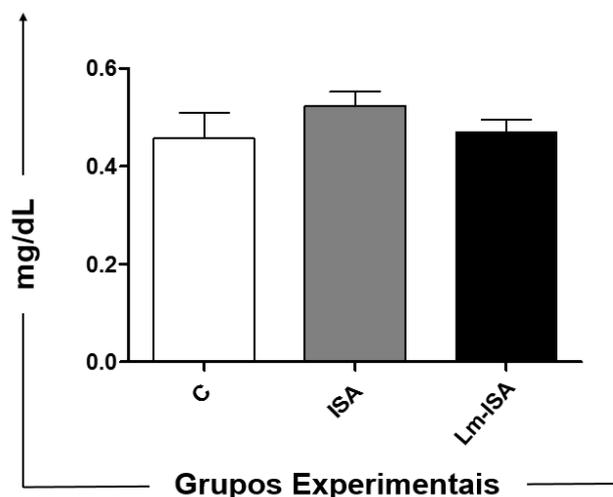


Figura 8 - Valores médios e desvio-padrão dos níveis séricos de creatinina de hamsters inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativos.

Posteriormente aos testes bioquímicos para o diagnóstico de comprometimento renal, foi avaliada a dosagem de enzimas como um método de diagnóstico de distúrbios hepáticos (HENRY, 2008). Dentre as enzimas dosadas estão a Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), relacionadas com a integridade dos hepatócitos, e a Fosfatase Alcalina (FA), indicativa de colestase (THRALL et al., 2007).

As aminotransferases (ALT e AST) estão presentes em diversas células do nosso organismo, sendo mais abundante nas células do fígado. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma dos hepatócitos, enquanto que a AST está presente em maiores concentrações na mitocôndria. Por ser considerada enzima de extravasamento e hepato-específica, somente uma lesão hepatocelular acarretaria na elevação dos níveis séricos de ALT. No caso da AST, que também está presente nas musculaturas esquelética e cardíaca, um aumento da sua atividade sérica só

pode ser considerado indicativo de lesão hepática, caso se elimine as possibilidades de lesões musculares e cardíaca (TENNANT, 1997; THRALL et al., 2007).

Conforme mostra a Figura 9, a dosagem de AST no sangue dos hamsters foi de $108,00 \pm 27,22$ UI/L para o grupo controle, $106,40 \pm 57,97$ UI/L para o grupo ISA e $83,35 \pm 29,58$ UI/L para o grupo Lm-ISA, enquanto que os níveis séricos de ALT foram de $68,63 \pm 27,22$ UI/L para o grupo controle, $57,67 \pm 25,63$ UI/L para o grupo ISA e $57,53 \pm 9,90$ UI/L para o grupo Lm-ISA. De forma geral, pôde-se observar que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. Além disso, todos os resultados obtidos se apresentaram dentro da faixa de referência mencionada por CARPENTER, (2005) e SUCKOW et al., (2012) (Tabela 1), indicando que não ocorreu hepatotoxicidade em decorrência da formulação proposta. Estes achados corroboram ainda com os estudos de MOREIRA e colaboradores (2016), o qual apresenta dados semelhantes para o grupo de animais saudáveis, com valores de 60-120UI/L para AST e 70-120UI/L para ALT.

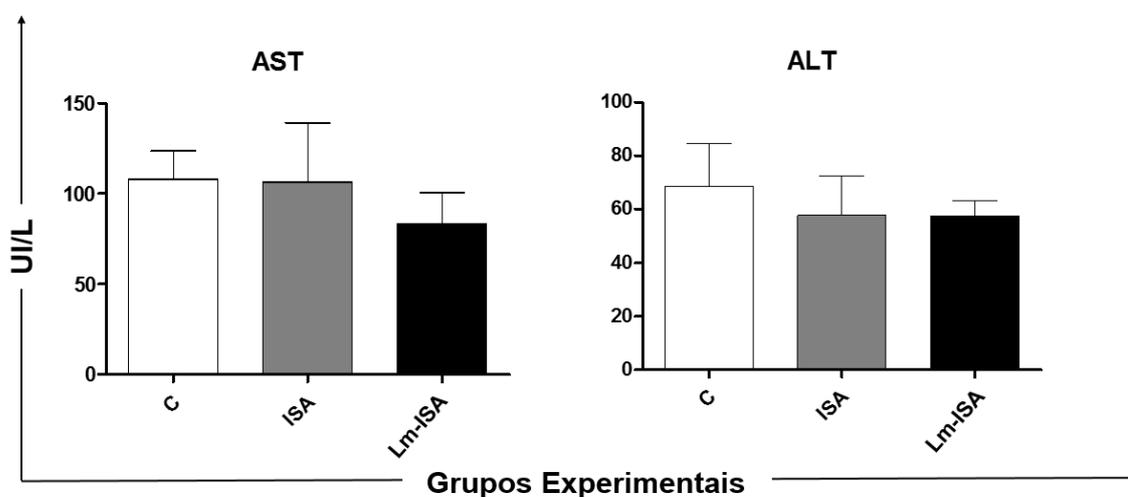


Figura 9 - Níveis séricos das enzimas AST e ALT. As dosagens dos níveis de AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) em UI/L foram efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativos.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima encontrada em diversos tecidos do corpo, principalmente tecido ósseo, fígado e rins. No fígado, é localizada na borda das células que se unem para formar canais biliares. Um aumento da sua concentração quando associada a outros testes hepáticos, tais como AST e ALT,

pode estar diretamente relacionado a distúrbios hepatocelulares, como no caso da colestase (TENNANT, 1997; LOPES et al., 2007).

No presente trabalho, a dosagem de FA encontrada nos animais foram de $81,55 \pm 18,78$ UI/L para o grupo controle, $63,43 \pm 12,30$ UI/L para o grupo ISA e $65,66 \pm 21,34$ UI/L para o grupo Lm-ISA (Figura 10). Por meio desses resultados nota-se que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos e que todos os valores obtidos se mantiveram dentro dos limites de normalidade descrito na literatura (Tabela 1), o que sugere que as formulações foram inócuas e não tóxicas.

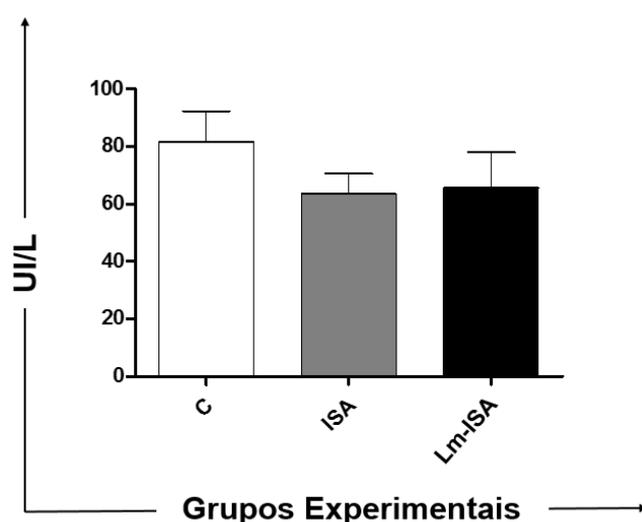


Figura 10 - Níveis séricos de FA. As dosagens dos níveis de FA (Fosfatase Alcalina), em UI/L foram efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com solução salina (C), adjuvante Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com o peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Lm-ISA). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5.2 Avaliação da série branca

5.2.1 Leucograma

O leucograma é um parâmetro fundamental para avaliar a resposta imune contra um agente infeccioso. Ao considerar o modelo hamster, a análise desta

variável se torna ainda mais importante devido à carência de reagentes disponíveis para o estudo da imunidade destes animais (AMORIM, 2015). Neste sentido, foi realizada a avaliação do quadro leucocitário, cujos resultados (leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) podem ser visualizados na Tabela 2.

Comumente, na LV humana e canina ativa, é observado um quadro de imunossupressão, caracterizado principalmente por uma expressiva queda na população de monócitos (monocitopenia), linfócitos (linfopenia) e eosinófilos (eosinopenia) (MOREIRA 2012b). Em uma análise preliminar, não foi observada alteração em relação aos valores percentuais de normalidade descritos por CARPENTER, (2005) e SUCKOW et al., (2012) (Tabela 3). Entretanto, uma redução significativa na população de monócitos (monocitopenia), um aumento na população de linfócitos (linfocitose) e eosinófilos (eosinofilia) foram os achados marcantes nos animais submetidos à imunização com a formulação vacinal proposta.

Tabela 2 - Leucograma de hamsters do grupo controle, ISA e Lm-ISA, obtidos 6 dias após a última dose vacinal.

Leucograma (/mm ³)	Controle	ISA	Lm-ISA
Global de Leucócitos (mm ³)	5131±1701	5289±2547	5699±1061
Neutrófilos Totais	1175 ± 181 22,9% ± 3,53%	1117 ± 129 21,12% ± 2,44%	971 ± 61 17,04% ± 1,07%
Eosinófilos	7 ± 6 0,13% ± 0,12%	33 ± 22 0,62% ± 0,41%	46 ± 16 ^a 0,81% ± 0,28%
Monócitos	301 ± 67 5,87% ± 1,30%	321 ± 61 6,07% ± 1,15%	130 ± 27 ^{a,b} 2,28% ± 0,47%
Linfócitos	3648 ± 162 71,10% ± 3,12%	3818 ± 169 72,19% ± 3,20%	4552 ± 66 ^{a,b} 79,87% ± 1,16%

Nota: Valores absolutos (média±desvio padrão) e percentuais do leucograma de hamsters inoculados com solução salina (controle), adjuvante montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante montanide ISA-61VG (Lm-ISA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a e b, relacionadas ao grupo controle e ao grupo ISA, respectivamente.

Tabela 3 - Valores de referências de análises da série branca no modelo hamster.

Parâmetro Leucocitário	Valores (%)
Neutrófilos	17-35
Eosinófilos	0-5
Monócitos	0-5
Linfócitos	50-96

Fonte: CARPENTER, 2005; SUCKOW et al., 2012.

De forma geral, esperava-se que a população de monócitos no plasma se mantivesse semelhante nos três grupos, uma vez que a coleta de sangue foi realizada 6 dias após a última dose vacinal e se tratando de monócitos, espera-se que sua concentração sérica esteja reduzida somente nas primeiras 72 horas da inflamação, período no qual migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos, fagocitam o antígeno e o apresenta às células T via MHC (GUIMARÃES e FILHO, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos conduzidos por MOREIRA e colaboradores (2009), que ao inocularem hamsters com componentes antigênicos de vacinas de leishmaniose visceral anti-canina Leishmune® e antígeno de *Leishmania braziliensis* (LB) com e sem adição de saponina (Sap), observaram que a vacina Leishmune® e LBSap promoveram uma redução tardia (7 dias) em monócitos circulantes no sangue periférico.

Sabendo que a migração dos monócitos para a área infectada é responsável pela indução de uma resposta imune, sugere-se que a baixa quantidade desta população no grupo Lm-ISA do presente estudo tenha sido por uma possível ação modulatória do antígeno, ou seja, o antígeno associado ao adjuvante pode ter estimulado maior recrutamento de células no local, degradado o antígeno, apresentado aos linfócitos e depois migrado para os linfonodos, reduzindo assim sua quantidade no sangue por um maior período (LEÓN et al., 2005; GUIMARÃES e FILHO, 2009). Este achado vai em concordância com o descrito por MOREIRA et al., (2009) que ao avaliarem a porcentagem de monócitos na derme, mostrou que a migração celular é precoce e persistente quando é inoculado antígenos de espécies dermatotrópicas tais como *L. major* e *L. braziliensis*.

Quanto ao número dos linfócitos, células associadas à imunidade adaptativa, nossos resultados se assemelham ao obtido por GIUNCHETTI et al., (2007), que

observaram um aumento desta população em cães inoculados com LBSap, 15 dias após a primeira imunização. Característica desejável em vacinas contra leishmaniose visceral, cujo perfil de resistência é voltado à resposta imune celular. Por se tratar de trabalhos cujos antígenos empregados foram de espécies dermatotrópicas, esta alteração pode ser um indicativo do efeito biológico característico da imunização, além de atuar como um marcador de imunogenicidade da vacina candidata (AMORIM, 2015).

De forma antagônica, MOREIRA et al., (2009) apresentaram números reduzidos de linfócitos circulantes no sangue em dois períodos diferentes (12 e 168h), para as vacinas LBSap e Leishmune®. Em seu estudo, estes dados mostraram influenciar diretamente a resposta local na área inoculada. Dessa forma, fica claro que a caracterização das subpopulações destas células e o perfil de citocinas devem ser levados em consideração para relacionar estes resultados de forma mais segura com a existência de memória imunológica (GIUNCHETTI et al., 2007; MOREIRA et al., 2009).

Se tratando dos eosinófilos, comumente, esta população está relacionada a eventos alérgicos, mas também pode ser influenciada por fatores como: reação de alarme, hormônios, adrenalina, stress, entre outros (NETO E LEVI, 1970). Assim, como não foi observado alterações clínicas aparentes, somente a dosagem de IgE antígeno-específico, poderia elucidar se a formulação proposta foi capaz de induzir um processo alérgico.

5.3 Sorologia anti-*Leishmania*

O estudo da resposta imune humoral, é outra variável importante a ser levada em consideração quando se pretende avaliar a antigenicidade induzida pela vacina. Os anticorpos anti-*Leishmania* são considerados um marcador essencial na LV, de forma que sua alta titulação está intimamente relacionada à ativação policlonal de células B, conduzindo a um quadro típico de hipergamaglobulinemia, que por sua vez se correlacionam com a progressão da doença em hamsters e não à proteção (MILES et al., 2005; SAHA et al., 2006; LARANGEIRA, 2008; NÝLEN e GAUTAM, 2010; MOREIRA, 2012a; KUMAR, 2013a; DAS e ALI, 2014).

No presente estudo, assim como mostra a Figura 11, as médias da titulação obtida no grupo controle (C) e no grupo que recebeu apenas o adjuvante (ISA) apresentaram valores relativamente baixos e idênticos (0,024), corroborando com os

estudos de MOREIRA, (2012a) que observou uma fraca resposta humoral no grupo de hamsters não vacinados e não infectados. Assim, a ausência de produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* nos grupos acima citados não foi surpreendente, pois como não foram imunizados era esperado que os valores da titulação fossem baixos.

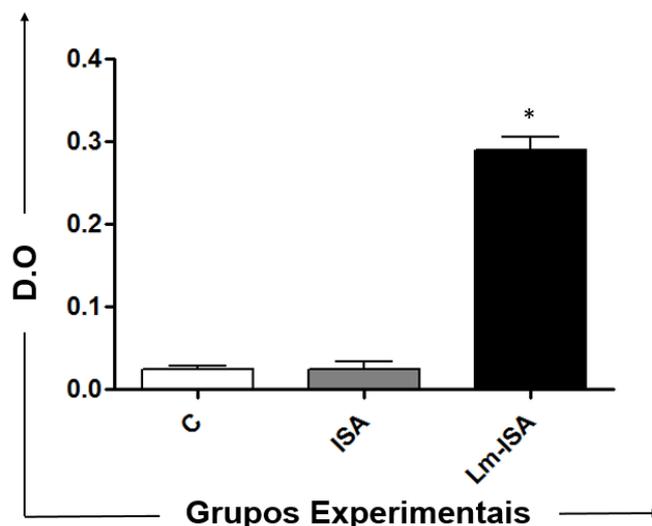


Figura 11 - Titulação de anticorpos IgG anti-*Leishmania* nos diferentes grupos experimentais: controle (C), adjuvante montanide ISA-61VG (ISA) e peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante montanide ISA-61-VG (Lm-ISA). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão de três hamsters por grupo, através de valores de densidade óptica (D.O). $P < 0.05$ foram considerados significativos.

Ao analisar a dosagem de anticorpos igG anti-*Leishmania* obtida no grupo de animais que receberam a formulação proposta, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa (0,289) em relação ao grupo C e ISA. Contudo, não é classificada como uma titulação alta, considerando que no protocolo experimental a diluição utilizada para o soro dos animais foi de 1:40. Achados semelhantes também foram observados por CAMPOS et al., (2011), que ao utilizarem uma diluição de 1:40 consideraram negativo os cães que apresentaram D.O menor que o ponto de corte (0,571). Da mesma forma, TEIXEIRA et al., (2011), utilizando o mesmo modelo animal e uma diluição de 1:400 consideraram baixos valores de D.O inferiores a 0,4.

Além destes autores, AGUIAR-SOARES e colaboradores (2014) ao conduzirem seus estudos com a vacina LBSapSal (antígenos de *L. brasilienses*, adjuvante saponina e extrato salivar de flebótomo), a uma diluição de 1:80, apresentou valores altamente estatísticos nos grupos imunizados (~0,310) em relação aos demais, entretanto não foram considerados elevados o suficiente para serem positivos.

Em contrapartida DAS e ALI (2014), observaram em seu trabalho um rápido aumento da IgG anti-*Leishmania*, aproximadamente 0,9-2,1, após a imunização dos hamsters com os antígenos, o que se justifica pela utilização do MPL-TDM, conhecido por aumentar a resposta humoral e a imunidade mediada por célula.

Nossos resultados vão ainda em concordância com o trabalho de PEREIRA (2015), que avaliou a capacidade protetora das histonas nucleossômicas de *L. infantum* (HIS) e a proteína ácida ribossômica P0 (LiP0) através de duas estratégias de imunização, utilizando o hamster como modelo experimental. Em seu experimento, antes do desafio, foi observado que os animais imunizados mostraram títulos de anticorpos significativamente mais elevados para ambos os antígenos, em relação aos outros grupos, todavia, os valores obtidos foram considerados baixos e a vacinação com o antígeno Lip0 homóloga foi considerada um componente potencial em uma formulação vacinal contra LV. Ainda em seu estudo, após o desafio, o autor demonstrou alta titulação de anticorpos nos hamsters imunizados, sugerindo a participação do antígeno na indução da resposta humoral uma vez que a dosagem de anticorpos foi feita alguns meses após o desafio experimental (ABBEHUSEN, 2011).

De fato GUPTA et al., (2012) ao conduzirem seus estudos com hamsters tratados com miltefosina observou que os títulos de anticorpos IgG aumentam com a carga de parasitos enquanto que níveis baixos é consistente com a diminuição delas.

5.4 Análise linfoproliferativa

A identificação da resposta antígeno-específica de linfócitos T é caracterizada principalmente por ensaios de linfoproliferação, um método baseado na manutenção de células mononucleares “*in vitro*”, que auxilia no estudo da resposta imune celular frente a um estímulo por mitógenos ou antígenos (RUITENBERG et al., (2001); LARANGEIRA, 2008). De acordo com GHOSE et al., (1980) a LV ativa induz a imunossupressão celular no hospedeiro, com ativação policlonal de células B. Por

outro lado, uma resposta imune protetora é manifestada por uma forte resposta linfoproliferativa positiva aos antígenos (REIS et al., 2014).

Neste contexto, para explorar a proliferação celular “*in vitro*” das células do baço de hamsters nos diferentes grupos experimentais, foi utilizado dois estímulos antigênicos diferentes: peptídeo sintéticos de *L. major* (ASLm) e antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi). O primeiro possibilitou avaliar a resposta linfoproliferativa de memória contra antígenos presentes na vacina e o segundo verificar possível homologia linfoproliferativa com o agente etiológico da LV (*L. infantum*).

Em nosso estudo foi observado atividade linfoproliferativa em todos os grupos do experimento, revelando similaridade entre aqueles que receberam apenas solução salina (controle) e adjuvante montanide ISA-61VG (ISA), cujos valores foram de 0,989 e 1,032 para a cultura controle (CC); 1,161 e 0,971 para ASLi e 1,040 e 0,701 para ASLm, respectivamente (Figura 12). Assim como nos trabalhos conduzidos por TEIXEIRA et al., (2011), que observaram uma variação de 1,25 - 0,4 em cães não imunizados, esta baixa estimulação obtida nos grupos no presente estudo é justificada pela ausência do antígeno no momento da inoculação nos animais.

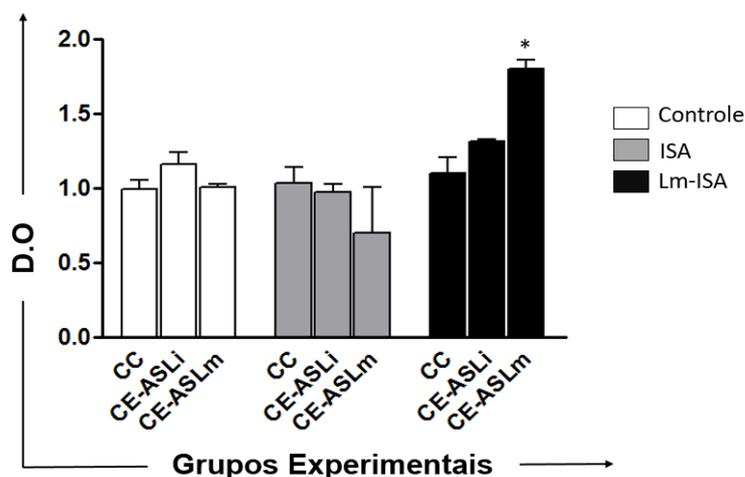


Figura 12 - Atividade linfoproliferativa de células mononucleares do sangue de hamsters (*Mesocricetus auratus*) obtido por ELISA após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) e peptídeo sintético de *L. major* (ASLm). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três animais por grupo. Os resultados estão representados por valores de densidade óptica (D.O). Foram considerados significativos $p < 0,05$.

Ao analisar os dados do grupo que foi imunizado com o peptídeo sintético de *L. major* associado ao adjuvante montanide ISA-61VG (Lm-ISA), foi observado maiores níveis de proliferação celular, com destaque para a cultura estimulada com o peptídeo de *L. major* (ASLm), que apresentou um aumento significativo em comparação com a CC e ASLi (Figura 12). De certa forma, estas respostas observadas, indicam que além da existência de memória imunológica o antígeno utilizado foi capaz de apresentar homologia com outra espécie do parasito (AGUIAR-SOARES et al., 2014). Nossos resultados vão em acordo com os estudos de DAS e ALI (2014), que ao avaliarem a eficiência das vacinas de CP contra LV, observaram que os esplenócitos de todos os hamsters vacinados proliferaram em resposta ao antígeno correspondente, com níveis significativamente maiores para a cultura estimulada com coquetel lisossômico.

Neste mesmo contexto, LAKSHMI e colaboradores, em 2014, relataram as propriedades imunogênicas da tuzin. Seus resultados demonstraram proliferação altamente significativa (~14vezes) nos camundongos imunizados com DNA da toxina, evidenciando a existência de memória imunológica relacionada com o antígeno da vacina.

De forma interessante KUMARI et al., (2012), testou a capacidade de frações solúveis e de membrana do antígeno amastigota da *Leishmania donovani* para induzir respostas celulares. Mediante seus dados observou que o grupo de hamster curados com miltefosina (anteriormente infectados com *L. donovani*) apresentou uma resposta imunológica linfoproliferativa de memória altamente significativa, dando suporte à utilização de algumas das frações para testes vacinais. Resultados semelhantes foram obtidos por GUPTA et al., (2012) e KUSHAWAHA et al., (2012).

No modelo canino, AGUIAR-SOARES et al., (2014), avaliou a proliferação celular frente a vacina LBSapSal, utilizando como estímulo: antígeno solúvel de *L. braziliensis* (VSA-antígeno da vacina) e antígeno solúvel de *L. infantum* (SLiA). Embora com um modelo experimental diferente, interessantemente o autor partiu da mesma premissa, cujo objetivo era utilizar um antígeno de uma espécie causadora da LT para conseguir resposta imunológica contra LV.

Em parte, os resultados de AGUIAR-SOARES et al., (2014) estão de acordo com os obtidos no presente estudo, em se tratando da atividade linfoproliferativa mais elevada nos animais imunizados com a vacina. Contudo, em seu trabalho, a maior proliferação foi observada na cultura estimulada com SLiA. A literatura também

relata a supressão da resposta linfoproliferativa específica ao antígeno de *Leishmania* durante a infecção e evolução da doença (MASIH et al., 2011; REIS et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

A partir da realização deste estudo que avaliou os eventos iniciais da resposta imune em hamsters, desencadeados pelo processo de imunização com um peptídeo sintético da gp63 de *Leishmania major*, foi possível concluir que a formulação proposta (grupo Lm-ISA):

- Foi inócua e atóxica para os animais, visto que não foi observado alterações da função renal e hepática;
- Gerou memória imunológica, ratificado tanto pelo aumento da população de linfócitos quanto pela alta atividade linfoproliferativa no grupo vacinal;
- Foi capaz de induzir uma resposta humoral anti-*Leishmania* (IgG total).

Os resultados obtidos dão suporte para que mais estudos relacionados ao candidato vacinal aqui avaliados, sejam desenvolvidos no modelo experimental cão, levando em consideração sua característica biológica de reservatório de *L. infantum* no ambiente urbano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, E.; KANG, C.; MARTINKOVIC, F.; SEMI?O-SANTOS, S. J.; SUNDAR, S.; WALDEN, P.; PIARROUX, R.; EL HARITH, A.; LOHOFF, M.; STEINHOFF, U. Heterogeneity of *Leishmania donovani* Parasites Complicates Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Comparison of Different Serological Tests in Three Endemic Regions. **PLOS ONE**. v.10, n.3, p.e0116408, 2015.

ABBEHUSEN, M.M.C. **Estudo da imunogenicidade de vacinas de *Mycobacterium smegmatis* recombinantes, expressando o gene que codifica a proteína ácida ribossomal de *Leishmania infantum* (LiP0), contra a infecção por *Leishmania chagasi* em hamster.** 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2011.

ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**. v. 21, n.7-8, p. 605-610, 2003.

AGGARWAL, P.; HANDA, R.; SINGH, S.; WALI, J.P. Kala-azar—new developments in diagnosis and treatment. **Indian Journal of Pediatrics**, v.66, n.1, p.63–71, 1999.

AGUIAR-SOARES, R. D.; ROATT B. M.; GAMA-KER, H.; MOREIRA, N. D.; MATHIAS, F. A. S.; CARDOSO, J. M. O. GONTIJO, N. F.; BRUNA-ROMERO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, A. O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4 + and CD8 +) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**. v.7, n.61, 2014.

AGUILAR, J. C.; RODRÍGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**. v.25, n.19, p.3752-3762, 2007.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. v.112, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J.; CROFT, S.L.; KAYE, P.; KHAMESIPOUR, A.; SUNDAR, S.; REED, S.G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v.31, p.B244–B249, 2013.

AMORIM, D.R. **Imunogenicidade de três frações antigênicas de *Leishmania amazonenses* como candidatos vacinais avaliados em hamster contra leishmaniose visceral.** (Mestrado em Biotecnologia). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G.; Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**. v.24, n.257, p.545-548, 1992.

BASU, M. K.; RAY, M. Macrophage and *Leishmania*: An Unacceptable Coexistence. **Critical Reviews in Microbiology**, v.31, n.3, p.145–154, 2005.

BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A. da; HADDAD, J.P.A.; MOREIRA, É.C.; MAGALHÃES, D.F. de; RIBEIRO, L.M.L.; FIÚZA, V. de O.P. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.24, n.4, p.777–784, 2008.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; BAUER, F.S.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; MORGADO, A.A.; SOARES, I.S.; BATISTA, L.M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral *leishmaniasis* in Brazil. **Vaccine**, v.26, n.39, p.4991-4997, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. 2017a. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Casos.pdf>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. 2017b. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Coeficiente%20de%20Incidncia.pdf>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Letalidade de Leishmaniose Visceral**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2015. 2017c. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Letalidade.pdf>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2017.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a leishmaniose visceral canina**. Portaria n. 176, de 03 de outubro de 2005. Disponível em: < http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/portaria_0176.htm>. Acessado em 07 de julho de 2017.

CALIXTO, P.H.M.; FAGUNDES, D.S.; OLIVEIRA, J.C.S. Estrutura tridimensional da Major Surface Protease de *Leishmania guyanensis* resolvida por modelagem comparativa. **Biota Amazônia**. v.4, n.1, p.74-80, 2014.

CAMPOS, D.R.; PALACIO, B.B.; OLIVEIRA, L.C.; DE ALMEIDA, S.L.H.; BRIDI, H.C.L.; PORFIRIO-PASSOS, G.; ZANINI, M.S. **Utilização da técnica de ELISA para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana em cães assintomáticos**. 2011. Disponível em: < <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/413.pdf>>. Acesso em 13 de abril de 2017.

CARPENTER, J.W. **Exotic Animal Formlary**. 3 ed. St. Louis: Elsevier, 2005. 434p.

CHANG, K.-P.; MCGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.1, n.1, p.1, 2002.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature Reviews Microbiology**. v.5, n.11, p.S7–S16, 2007.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v.27, n.1, p.43–52, 1988.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 128, p.149–155, 2005.

DANTAS-TORRES, F. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. 2006. 96p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife 2006.

DAS, A.; ALI, N. Combining Cationic Liposomal Delivery with MPL-TDM for Cysteine Protease Cocktail Vaccination against *Leishmania donovani*: Evidence for Antigen Synergy and Protection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.e3091, 2014.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R.C.S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. da C.; TAVARES, D. de H.C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.A.; SILVA, R. de F.; PEREIRA, V.R.A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**. v.5, n.1, p.31, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DREAMSTIME. **Promastigotes of Leishmania parasite**. Disponível em: <<https://pt.dreamstime.com/ilustra%C3%A7%C3%A3o-stock-promastigotes-do-parasito-de-leishmania-image90671910>>. Acessado em 04 de março de 2017.

DUMMER, L. A.; ARAUJO, I. L.; FINGER, P. F.; SANTOS, A. G.; ROSA, M. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; FISCHER, G.; HURK, S. V. D. L-V. D.; LEITE, F. P. L. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5glycoprotein D. **Vaccine**, v. 32, n.21, p. 2413-2419, 2014.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Liver. In:_____. **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3 ed. IOWA: State University, 1994. cap. 7, p.130-151.

ELMAHALLAWY, E. K.; SAMPEDRO MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; NAVARRO MARI, J.M.; GUTIERREZ

FERNANDEZ, J.; FERNANDEZ, J. G. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v.8, n.8, p.961–972, 2014.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v.2012, p.892817, 2012.

FERREIRA, J. L. **Leishmaniose visceral canina (LVC)**. 2011. 33p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária). São José dos Campos, Universidade Paulista, 2011.

FUKUTANI, K. F.; FIGUEIREDO, V.; CELES, F. S.; CRISTAL, J. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; DE OLIVEIRA, C. I. Serological survey of Leishmaniainfection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v.14, n.1, p.422, 2014.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**. v.123, n.3, p.439-54, 2006.

GENARO, O.; REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 47-64.

GHOSE, A.C.; HALDAR, J.P.; PAL, S.C.; MISHRA, B.P.; MISHRA, K.K. (1980). Serological investigations on Indian kala-azar. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 40, n.2, p.318-326, 1980.

GHOSH, P.; BHASKAR, K. R. H.; HOSSAIN, F.; KHAN, M. A. A.; VALLUR, A. C.; DUTHIE, M. S.; HAMANO, S.; SALAM, M. A.; HUDA, M. M.; KHAN, M. G. M.; COLER, R. N.; REED, S. G.; MONDAL, D. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**. v.9, n.1, p.383, 2016.

GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.D.; MALAQUIAS, L.C.; CASTRO, L.L.M.; LANA, M.; REIS, A.B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v.25, n.44, p.7674-86, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GROOT, A.S. DE; RAPPUOLI, R. Genome-derived vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v.3, n.1, p.59–76, 2004.

GUERIN, P. J; OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S. L., DESJEUX, P., WASUNNA, M. K., BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis:

current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet. Infectious Diseases**, v.2, p.494– 501, 2002.

GUIMARÃES, M.C.C.; GAMA FILHO, R.V. Diferenciação de Monócitos-macrófagos de *Gallus gallus*: uma abordagem morfológica. **Perspectivas online**. v.3, n.9, 2009.

GUPTA, R.; KUSHAWAHAT, P.K.; SAMANT, M.; JAISWAL, A.K.; BAHARIA, R.K.; DUBE, A. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.67, n.2, p.440-443, 2012.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403-409, 2011.

HE, L.; ZHU, J. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation. **Current opinion in virology**. v.11, p.103–12, 2015.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. São Paulo: Manole, 2008. 1670p.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **The Lancet**. v.354, p.1191-1199, 1999.

HIDE, M.; BUCHETON, B.; KAMHAWI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; SUNDAR, S.; LEMESRE, J.-L.; BAÑULS, A.-L. Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. In: **TIBAYRENC, M. Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007. cap. 6, p. 87-123.

ISNARD, A.; SHIO, M.T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.2, p.72, 2012.

JOSHI, P.B.; KELLY, B.L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D.L.; McMASTER, W.R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular and biochemical parasitology**. v.120, n.1, p.33–40, 2002.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**. v.34, n.2, p.595-598, 1970.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.10, p.1462–1470, 2011.

KIMA, P. E.; RUDDLE, N. H.; MCMAHON-PRATT, D. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8+ T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**. v.159, n.4, p.1828–34, 1997.

KUMAR, A. Experimental Model for Leishmaniasis. In:_____. **Leishmania and Leishmaniasis**. New York: Springer, 2013b. p.69-83.

KUMAR, A. Immunology of *Leishmania*. In: _____. ***Leishmania and Leishmaniasis***. New York: Springer, 2013a. p.13-28.

KUMARI, S.; MISRA, P.; TANDON, R.; SAMANT, M.; SUNDAR, S.; DUBE, A. *Leishmania donovani*: Immunostimulatory Cellular Responses of Membrane and Soluble Protein Fractions of Splenic Amastigotes in Cured Patient and Hamsters. **Plos one**, v.7, n.1, p.e30746, 2012.

KUSHAWAHA, P.K.; GUPTA, R.; TRIPATHI, C.D.P.; KHARE, P.; JAISWAL, A.K.; SUNDAR, S.; DUBE, A. *Leishmania donovani* Triose Phosphate Isomerase: A Potential Vaccine Target against Visceral Leishmaniasis. **Plos one**. v.7, n.9, p.e45766, 2012.

LAKSHMI, B.S.; WANG, R.; MADHUBALA, R. *Leishmania* genome analysis and high-throughput immunological careening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.32, n.30, p.3816-3822, 2014.

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHRPE, D. BLACKWELL, J.M. Nramp1 transfection transfers lty/lsh/bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. **Infection and Immunity**, v.65, n.2, p.380–386, 1997.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação como a transmissibilidade para o vetor.** (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v.17, n.4, p.313-318, 2005.

LI, W.; JOSHI, M. D.; SINGHANIA, S.; RAMSEY, K. H.; MURTHY, A. K. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. **Vaccine**. v.2, n.3, p.515–36, 2014.

LILJEROOS, L.; MALITO, E.; FERLENGHI, I.; BOTTOMLEY, M. J. Structural and Computational Biology in the Design of Immunogenic Vaccine Antigens. **Journal of Immunology Research**. v. 2015, p.1–17, 2015.

LIN, S.Y.; CHENG, C.W.; SU, E.C. Prediction of B-cell epitopes using evolutionary information and propensity scales. **BMC bioinformatics**. v.14 Suppl 2, p.S10, 2013.

LIRA, E.R. **A gênese de Palmas – Tocantins**. 1995. 313p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Planejamento Ambiental). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Presidente Prudente, 1995.

LOPES, S. T. dos A.; CUNHA, C. M. S.; BIONDO, A. W.; FAN, L.C. **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1996.166p.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. Função Pancreática. In: _____. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Universidade Federal de Santa Maria. 3ª ed. Santa Maria, 2007. p. 75-85.

LORÍA-CERVERA, E.N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F.J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.56, n.1, p.1-11, 2014.

LUKES, J; MAURICIO, I. L; SCHONIAN, G; DUJARDIN, J. C; SOTERIADOU, K. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.22, p.9375–9380, 2007.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.6, n.1, p.e1484, 2012.

MARITZ-OLIVER, C.; VAN ZYL, W.; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne disease**, v.3, n.3, p.179-187, 2012.

MAROLI, M., L. GRADONI, G. OLIVA, M. CASTAGNARO, A. CROTTI, G. LUBAS, S. PALTRINIERI, X. ROURA, E. ZINI AND A. ZATELLI. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, n.11, p.1200-1206, 2010.

MASIH, S.; ARORA, S.K.; VASISHTA, R. K. Efficacy of *Leishmania donovani* ribosomal P1 gene as DNA vaccine in experimental visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**. v.129, n.1, p. 55-64, 2011.

MAURICIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**. v. 16, n.5, p. 188-189, 2000.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R.E.; SCHWARTZ, H.; RUSSEL, D.G. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.37, n.2, p.263-273, 1989.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J.E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **The Journal of Immunology**., v.166, n.3, p.1912-1920, 2001.

MERRIFIELD, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**. v.85, n.14, p.2149-2154, 1963.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 31-35.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 41-46.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 67-83.

MICHALIK, M. et al. Reverse Vaccinology: The Pathway from Genomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. v.1403, p.87–106, 2016.

MILES, S.A.; CONRAD, S.M.; ALVES, R.G.; JERONIMO, S.M.B.; MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.201, n.5, p.747-754, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: MS, 2006.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, C. L.; GARCIA, G.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. v.64, n.2, p.108-131, 2012.

MOODY, A. H.; CHIODINI, P. L. Methods for the detection of blood parasites. **Clinical and Laboratory Haematology**. v.22, n.4, p.189–201, 2000.

MOREIRA, N. D. **História natural da leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de *Leishmania infantum* com perfis distintos de virulência e patogenicidade**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2012b.

MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P.M. COURAVITAL, W.; CARDOSO, J. M. O.; REZENDE, M. T.; KER, H. G.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**. v.9, p.181, 2016.

MOREIRA, N.D. **Cinética da Migração Celular Intradérmica em Hamsters Sensibilizados com Diferentes Constituintes Antigênicos de duas Vacinas Contra Leishmaniose Visceral Canina**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2008.

MOREIRA, N.D.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B.M.; MALAQUIAS, L.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunization with two different

vaccines against visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, n.4, p.418-424, 2009.

MOREIRA, N.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B.M.; VIEIRA, P.M.; KER, H.G.; CARDOSO, J.M.O.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; DE LANA, M.; REIS, A.B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: "Leishman Donovan Units" versus Real-Time PCR. **Plos one**. v.7, n.10, p. e47907, 2012a.

MORIEL, D.G.; SCARSELLI, M.; SERINO, L.; MORA, M.; RAPUOLLI, R.; MASIGNANI, V. Genome-based vaccine development: A short cut for the future. **Human Vaccines**. v.4, n.3, p.184–188, 2008.

MOTA, E.F.; LIMA, M.G.S.; MELO, D.F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v.16, n.2, p.79-99, 2006.

NABEL, G. J. Designing Tomorrow's Vaccines. **New England Journal of Medicine**. v.368, n.6, p.551–560, 2013.

NETO, F.A.V.; SOUSA, A.K.S.; MARQUES, M.V.; ARRUDA, D.S. SILVA, L.A. Avaliação de parâmetros bioquímicos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista de Ciências da Saúde**. v.13, n.2, p.131-140, 2011.

NETO, V.A.; LEVI, G.C. Causas de eosinofilia sanguínea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.4, n.1, p.51-68, 1970.

NÝLEN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**. v.2, n.2, p.135-146, 2010.

OGRA, P.L.; FADEN, H.; WELLIVER, R.C. Vaccination strategies for mucosal immune response. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.430-445, 2001.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V.D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M.T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease gp63. **Microbes and Infection**. v.14, n.15, p.1377-1389, 2012.

OSMAN, M.; MISTRY, A.; KEDING, A.; GABE, R.; COOK, E.; FORRESTER, S.; WIGGINS, R.; DI MARCO, S.; COLLOCA, S.; SIANI, L.; CORTESE, R.; SMITH, D.F.; AEBISCHER, T.; KAYE, P.M.; LACEY, C.J. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in- human trial of ChAd63-KH. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005527, 2017.

PARTATA, A.K. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana em Araguaína (TO) e Diagnóstico Sorológico da Doença**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2010

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. v.22, n.1, p.1-13, 1996.

PEREIRA, L.; ABBEHUSEN, M.; TEIXEIRA, C.; CUNHA, J.; NASCIMENTO, I. P.; FUKUTANI, K.; DOS-SANTOS, W.; BARRAL, A.; OLIVEIRA, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; SOTO, M.; BRODSKYN, C. I. Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v.9, n.2, p.e0003490, 2015.

PEREIRA, L.S. **Avaliação das histonas de *L. infantum* como candidatos à vacinas na infecção por *L. infantum* em hamsters**. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2013.

PIMENTA, P.F.P.; FREITAS, V.C.; SECUNDINO, N.F.C.A. Interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. In: NETO, M.A.C.S.; WINTER, C., TERMIGNONI, C. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 2012. p.1-45.

PISCOPO, T. V.; MALLIA A. C. *Leishmaniasis*. **Postgraduate Medical Journal**. v.82, n.972, p.649-57, 2006.

RAFATI, S.; NAKHAE, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DARABI, H.; ERAVANI, D.; SANOS, S.; KAYE, P.; TAGHIKHANI, M.; JAMSHIDI S.; RAD, M.A. 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**. v.23, n.28, p.3716-3725, 2005.

RAMIRO, M. J., ZARATE, J. J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J. A.; 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**. v.21, n.19-20, p.2474-2484, 2003.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**. v.3, n.5, p. 445-450, 2000.

RAPPUOLI, R.; ADEREM, A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. **Nature**. v.473, n.7348, p.463–9, 2011.

RAPPUOLI, R.; MANDL, C. W.; BLACK, S.; DE GREGORIO, E. Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews Immunology**. v.11, n.12, p.865–72, 2011.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**. v.6, p.147–54, 2014.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; ROATT, B. M.; COURA-VITAL, W.; NICOLATO, C. R.; SILVEIRA-LEMOS, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. de A. Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral Leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.157, n.3-4, p.190-196, 2014.

REIS, L. C.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, M.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**. v.35, n.2, p.103-115, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v.45, n.1, p.21-25, 2007.

RIBEIRO, R.S.P. **Incidência e epidemiologia da leishmaniose visceral no norte do Tocantins**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2010.

RINAUDO, C.D.; TELFORD, J.L.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K.L. Vaccinology in the genome era. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, n 9, p.2515–2525, 2009.

RIVIER, D.; BOVAY, P.; SHAH, R.; DIDISHEIM, S.; MAUEL, J. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite Immunology**, v.21, n.9, p.461-473, 1999.

RODRIGUEZ-CORTES, A., OJEDA, A.; LOPEZ-FUERTES, L.; TIMON, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**. v.25, n.46, p.7962-7971, 2007.

RUITENBERG, E.J.; SOLANO-GALLEGO, L.; MONEN, J.; PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.M.G. Immune responses in canine leishmaniasis. **Sumaries of Presentations at the International Canine Leishmaniasi Forum**. p.32-36, 2001.

SAHA, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, A.; GHOSE, J.; BHOWMICH, S.; ALI, N. Immune responses in kala-azar. **The Indian Journal of Medical Research**. v.123, n.2, p.245-266, 2006.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**. v.53, n.1, p.8–16, 2016.

SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H.; D'AVILA-LEVY, C.M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.78, n.4, p.687-714, 2006.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**. v. 9, n. 6, p. 588–96, 2015.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Leishmania**. Disponível em:<<https://www.sciencephoto.com/>>. Acesso em: 12 de Janeiro de 2017.

SEIB, K.L.; DOUGAN, G.; RAPPUOLI, R. The Key Role of Genomics in Modern Vaccine and Drug Design for Emerging Infectious Diseases. **Plos Genetics**. v.5, n.10, p.e1000612, 2009.

SEPPIC. **Montanide™ Adjuvant Ranges.** Disponível em: <<https://www.seppic.com/sites/seppic/files/2017/02/28/seppic-montanide.pdf>>. Acesso em: 22 de agosto de 2017.

SESARDIC, D. Synthetic peptide vaccines. **Journal of Medical Microbiology.** v.39, n.4, p.241–242, 1993.

SEYED, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Post-Genomics and Vaccine Improvement for *Leishmania*. **Frontiers in Microbiology.** v.7, p.467, 2016.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distributions, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Disease,** v. 45, n.4, p. 255-72, 2008.

SILVA, A.L.; ROSALIA, R.A.; VARYPATAKI, E.; SIBUEA, S.; OSSENDORP, F.; JISKOOT, W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter of immune activation. **Vaccine,** v.33, n.7, p.847-854, 2015.

SILVA, S. M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de belo horizonte.** 2007. 133p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **The Indian Journal of Medical Research.** v.123, n.3, p.411–422, 2006.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology Research.** v.110, n.3, p.1065–1078, 2012.

STOCKHAM L.S.; SCOTT, M. S. Urinary system. In:_____. **Fundamentals of veterinary clinical pathology.** Iowa: Iowa State, 2002. p. 277-336.

SUCKOW, M.A.; STEVENS, K.A.; WILSON, R.P. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.** San Diego: Academic Press, 2012. p.57-116.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology.** v.9, n.5, p.951–8, 2002.

TEIXEIRA, M. C. A.; OLIVEIRA, G. G. de S.; SANTOS, P. O. M.; BAHIENSE, T. C.; SILVA, V. M. G.; RODRIGUES, M. S.; LARANGEIRA, D. F.; DOS-SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz.** v.106, n.2, p.182-189, 2011.

TENNANT, B. C. Hepatic Function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. C. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. v.1, cap.13, 932p.

THOMPSON, A. L.; STAATS, H. F. Cytokines: The Future of Intranasal Vaccine Adjuvants. **Clinical and Developmental Immunology**. v.2011, p.1–17, 2011.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. Roca: São Paulo, 592 p., 2007.

TOCANTINS, 2012. Portal da Saúde. **Análise de Situação de Saúde Estado do Tocantins 2007 a 2012**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2017.

TOMPSON, F.N.; WARDROP, K.J. Clinical chemistry and hematology. In: HOOSSIER, G.L.V.JR.; McPHERSON, C.W. **Laboratory Hamsters**. 1 ed. London: Academic Press, 1987. v.1, cap.3, p. 43-58.

WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5 ed., St Louis: Elsevier, 2012. 432p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. 2011. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/; apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory Data Repository**. WHO, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

YANG, H.; KIM, D.S. Peptide Immunotherapy in Vaccine Development: From Epitope to Adjuvant. **Advances in protein chemistry and structural biology**. v.99, p.1-14, 2015.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**. v.132, n.1, p.1–16, 2003.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 288 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Desenvolvimento Biotecnológico de Um Novo Candidato Vacinal de Peptídeo Sintético contra Leishmaniose Visceral Canina”, que tem como responsável Kelvinson Fernandes Viana, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/10/2013. Este certificado expira-se em 25/10/2017.

CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 288 / 2013, related to the Project entitled “Biotechnological Development A New Synthetic Peptide Vaccine Candidate against Canine Visceral Leishmaniasis”, under the supervision of Kelvinson Fernandes Viana, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/10/2013. This certificates expires in 25/10/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 25/10/2013.

Atenciosamente.

SistemaCEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>