



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

**MAURICIO OVIEDO PACIELLO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL  
CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CONSTITUÍDA DE PEPTÍDEOS  
SINTÉTICOS DA GP63 DE *Leishmania major* COM PREDIÇÃO PARA  
MHC-I/MHC-II**

**GURUPI - TO  
2017**



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

**MAURICIO OVIEDO PACIELLO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL  
CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CONSTITUÍDA DE PEPTÍDEOS  
SINTÉTICOS DA GP63 DE *Leishmania major* COM PREDIÇÃO PARA  
MHC-I/MHC-II**

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**

---

P117a Paciello, Mauricio Oviedo.  
Avaliação da resposta imunológica de uma formulação vacinal  
contra leishmaniose visceral constituída de peptídeos sintéticos da  
gp63 de *Leishmania major* com predição para MHC-I/MHC-II. /  
Mauricio Oviedo Paciello. – Gurupi, TO, 2017.  
64 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do  
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-  
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2017.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana

1. Leishmaniose visceral. 2. Hamster. 3. Vacina. 4. Gp63. 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).**

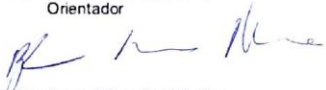



**Ata de Defesa nº 29/2017**

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MAURICIO OVIEDO PACIELLO DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.**


Aos 27 dias do mês de abril do ano de 2017, às 14 horas, na sala 15, edifício BALA II, campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. KELVINSON FERNANDES VIANA da Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. BERGHEM MORAIS RIBEIRO da Universidade Federal do Tocantins e Prof Dr LUIZ DA SILVEIRA NETO da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MAURICIO OVIEDO PACIELLO, intitulada "Avaliação da resposta imunológica de uma formulação vacinal contra leishmaniose visceral constituída de peptídeos sintéticos da GP63 de *Leishmania major* com predição para MHC-I/MHC-II". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-o ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana  
Universidade Federal do Tocantins  
Orientador

  
Prof. Dr. Berghem Moraes Ribeiro  
Universidade Federal do Tocantins  
1º Examinador

  
Prof. Dr. Luiz da Silveira Neto  
Universidade Federal do Tocantins  
2º Examinador

Gurupi, 27 de abril de 2017.

  
Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

## **DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO**

Dedico aos meus pais, Luis Alfredo Oviedo Aguiar e Nely Paciello da Silva pelo exemplo, aconselhamentos e motivação em minha vida. Aos meus irmãos, Patricia, Marcelo e Luisa Fernanda, pelo companheirismo, apoio e carinho que sempre tiveram comigo. Aos meus sobrinhos Nicole, Marcelinho, Eduardo e Bernardo pela alegria, esperança e sonhos que despertam.

Agradeço a UFT que proporcionou condições de aprendizado durante toda a etapa de pesquisa e em especial ao Doutor Kelvinson Fernandes Viana pela orientação no desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço de forma especial a minha namorada Larissa Pinheiro Silva que tem estado comigo, compartilhando e me dando suporte em minhas trajetórias.

## RESUMO

A leishmaniose é considerada como uma das seis endemias prioritárias no mundo. Sua gravidade vai depender da espécie contaminante, podendo variar de uma lesão cutânea relativamente branda a uma infecção visceral que pode ser fatal na ausência de tratamento. 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 teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral e celular de uma nova formulação vacinal contra a leishmaniose visceral (VL) usando hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental. A formulação vacinal foi constituída por dois peptídeos sintéticos da protease gp63 na *Leishmania major* com alta predição de MHC-I e II. A preparação dos peptídeos teve início com a sua predição, utilizando o *software* SYFPEITHI, seguida da síntese química destes, usando a metodologia de fase sólida, segundo o protocolo padrão de Merrifield (1963). A purificação e identificação dos peptídeos foi realizada por meio de cromatografia líquida sob condições de baixa pressão. Nove animais com idade de 4-8 semanas foram selecionados de forma aleatória e divididos em três grupos experimentais: o grupo controle, o grupo imunizado com o adjuvante montanide (ISA) e o grupo imunizado com a associação dos peptídeos + adjuvante Montanide (Pep+ISA), cada grupo contendo três animais. Os inóculos dos diferentes grupos experimentais foram administrados via subcutânea em três doses vacinais em intervalos de 14 dias. O grupo controle recebeu 100 µL de solução salina estéril a 0,85%, o grupo ISA recebeu 30 µL do adjuvante oleoso Montanide ISA-61VG diluído em 70 µL de solução salina 0,85% e o grupo Pep+ISA recebeu 30 µL do peptídeo MHC-I + 30 µL do peptídeo MHC-II, emulsionados em 30 µL do adjuvante Montanide ISA-61VG e diluídos em 10 µL de solução salina 0,85%. Seis dias após a última dose da vacina, os animais foram sedados com Clortamina® (50 mg/mL) por via intraperitoneal e o sangue coletado para prosseguir com as análises hematológicas, bioquímicas e sorológica. Após 205 dias da última dose vacinal, os animais foram eutanasiados e seus baços coletados para avaliação da resposta linfoproliferativa. Os resultados bioquímicos demonstraram que a composição vacinal não teve ação tóxica, apresentando níveis séricos de ureia, creatinina e das enzimas hepatocelulares dentro das taxas normalidade do funcionamento renal e hepático. A formulação vacinal também exibiu níveis significativos de anticorpos e a existência de memória imunológica, evidenciada pelo aumento da atividade linfoproliferativa nas culturas de esplenócitos, quando comparado o grupo que recebeu a vacina com os demais grupos experimentais.

Palavras-chave: ensaio imunoenzimático, epítipo, bioinformática, glicoproteína, linfócitos T.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is considered one of the six endemics priority in the world. Its severity will depend on the contaminating species, and may range from a relatively mild cutaneous lesion to a visceral infection that can be fatal in the absence of treatment. Now a days, one of the major challenges encountered in studies of the increasing urbanization of visceral leishmaniasis (VL) is the development of highly effective vaccines to induce protection against *Leishmania* infection. In this context, the present study aimed to evaluate the humoral and cellular immune response of a new vaccine formulation against visceral leishmaniasis (VL) using hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model. The vaccine formulation consists of two synthetic peptides of the gp63 protease in *Leishmania major* with high prediction of MHC-I and II. The preparation of the peptides started with their prediction, using SYFPEITHI software, followed by their chemical synthesis, using the solid phase methodology, according to the standard protocol of Merrifield (1963). The peptides' purification and identification of th was performed by liquid chromatography under low pressure conditions. Nine animals aged 4-8 weeks were randomly selected and divided into three experimental groups: the control group, the group immunized with the adjuvant montanide (ISA) and the group immunized with peptide + adjuvant montanide association (Pep + ISA), each group containing three animals. Inoculations of the different experimental groups were administered subcutaneously at three vaccine doses at 14 day intervals. The control group received 100  $\mu$ L of 0.85% sterile saline, the ISA group received 30  $\mu$ L of the Montanide ISA-61VG oily adjuvant diluted in 70  $\mu$ L of 0.85% saline and the Pep + ISA group received 30  $\mu$ L of the MHC-I peptide + 30  $\mu$ L of the MHC-II peptide, emulsified in 30  $\mu$ L of the Montanide ISA-61VG adjuvant and diluted in 10  $\mu$ L of 0.85% saline solution. Six days after the last vaccine dose, the animals were sedated with Chlortamine® (50 mg / mL) intraperitoneally and the blood collected to proceed with hematological, biochemical and serological analyzes. After 205 days of the last vaccine dose, the animals were euthanized and their spleens collected for evaluation of the lymphoproliferative response. The biochemical results showed that the vaccine composition had no toxic action, presenting serum levels of urea, creatinine and hepatocellular enzymes within the normal range for renal and hepatic functioning. The vaccine formulation also showed significant levels of antibodies and the existence of immunological memory evidenced by the increase in lymphoproliferative activity in splenocyte cultures, when compared to the group that received the vaccine with the other experimental groups.

Keywords: immunoenzymatic assay, epitope, bioinformatics, glycoprotein, T lymphocytes.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
2.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	16
2.1.1	<i>O agente etiológico e morfologia do parasito</i>	16
2.1.2	<i>Epidemiologia e Distribuição</i>	17
2.1.3	<i>Vetor e Transmissão</i>	19
2.1.4	<i>Ciclo biológico</i>	19
2.1.5	<i>Reservatórios</i>	21
2.1.6	<i>A interação parasito-hospedeiro</i>	23
2.1.7	<i>Resposta imunológica do hospedeiro</i>	23
2.2	DESENVOLVIMENTO DE VACINAS A PARTIR DA BIOINFORMÁTICA	25
2.3	VACINAS DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	25
2.4	HAMSTER COMO MODELO DE PROGRESSÃO CLÍNICA	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
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 E PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
4.6	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE	33
4.7	ANÁLISE DE INOCUIDADE E TOXICIDADE	33
4.7.1	<i>Avaliação bioquímica</i>	33
4.7.2	<i>Avaliação hematológica</i>	34
4.8	SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	34
4.9	LINFOPROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37



<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1	BIOQUÍMICA CLÍNICA .....	38
5.1.1	<i>Função renal</i> .....	38
5.1.2	<i>Função hepática</i> .....	41
5.2	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA .....	43
5.2.1	<i>Leucograma</i> .....	43
5.3	DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI- <i>LEISHMANIA</i> EM SOROS DE HAMSTERS PELO MÉTODO DE ELISA.....	45
5.4	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA.....	48
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ALT	Alanina Aminotransferase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AST	Aspartato Aminotransferase
C3b	Proteína sérica do sistema complemento
C3bi	Proteína sérica do sistema complemento inativada
CC	Cultura Controle
CE-ASLc	Cultura Estimulada com Antígeno Solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>
CE-Pep	Cultura Estimulada com Peptídeo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CR1	Sítio receptor nos macrófagos
CR3	Sítio receptor nos macrófagos
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
EDT	Etanoditiol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	Fosfatase Alcalina
Fmoc	9-Fluorenil-metiloxicarbonila
GP63	Glicoproteína de 63kDa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ISA	Adjuvante Montanide ISA-61VG
LabVac	Laboratório de Biomoléculas e Vacinologia
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I

MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
MTT	(3-(4,5dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Pep	Peptídeo
PSP	Promastigote Surface Protease
SFB	Soro Fetal Bovino
SLA	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
sp	Espécie
spp.	Espécies
t-Bu	terc-butílicos
TCD4+	Linfócitos T auxiliares
TCD8+	Linfócitos T citotóxicos
TFA	Ácido Trifluoroacético
TH	Linfócitos T <i>helper</i>
TH1	Células TCD4 Secretoras do Padrão 1 de Citocinas
TH2	Células TCD8 Secretoras do Padrão 2 de Citocinas
TIS	Triisopropilsilano
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFT	Universidade Federal do Tocantins

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Situação epidemiológica de Leishmaniose Visceral em 2015, no Brasil.	18
Tabela 2 - Valores bioquímicos séricos em hamster para ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)..	40
Tabela 3 - Leucograma dos três grupos experimentais (controle, adjuvante e peptídeos + adjuvantes) obtido da coleta sanguínea após seis dias da última dose vacinal. ....	44
Tabela 4 - Valores de referência de análises hematológicas em hamsters. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas morfológicas da <i>Leishmania</i> spp. (A) amastigota e (B) promastigotas. (Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY; CAMARGO E LANGONI, 2006)	16
Figura 2 – Inseto vetor ( <i>Lutzomyia longipalpis</i> ) exercendo hematofagia. (Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY).	19
Figura 3 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp. no hospedeiro mamífero no vetor. (Fonte: ADAPTADO DE HANDMAN, 2001).	21
Figura 4 – Principais reservatórios da LV. (A) raposa ( <i>Cerdocyon thous</i> ); (B) cão ( <i>Canis familiaris</i> ). (Fonte: SILVEIRA et al., 2016).	22
Figura 5 – Vias de processamento e apresentação de antígeno. (a) captação do antígeno; (b) processamento do antígeno; (c) biossíntese do MHC; (d) formação do complexo peptídeo-MHC; (e) expressão dos complexos de peptídeo-MHC na superfície. (Fonte: ABBAS et al., 2011).	24
Figura 6 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp63 da <i>Leishmania major</i> . (Fonte: PROTEIN DATA BANK, 2016).	30
Figura 7 – (A) Administração dos inóculos por via subcutânea. (B) coleta de sangue através da punção intracardíaca.	33
Figura 8 – Lavagem da placa com solução de PBS-tween 20. (A) Processo de lavagem (B) retirada do excesso de solução dos poços.	34
Figura 9 – Anticorpo Anti-Hamster produzido em cabra utilizado como marcador para determinar os níveis de anticorpos igG, anti- <i>Leishmania</i> .	35
Figura 10 – (A) Adição da solução de parada (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ). (B) placa com todos os poços contendo H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . (C) leitura da placa em um leitor automático.	35
Figura 11 – Processo de obtenção de células do baço de hamster. (A) baço recém retirado dos hamsters. (B) maceração manual do baço utilizando um bastão de vidro. (C) transferência do sobrenadante para o tubo de ensaio após maceração. (D) tubo de ensaio com sobrenadante e meio RPMI.	36
Figura 12 – Preparação da placa para determinar a quantidade de células viáveis. (A) Adição de MTT. (B) Aspiração do sobrenadante e visualização dos cristais de formazan. (C) homegeinização dos cristais de formazan. (D) leitura das absorbâncias a 540nm.	37

Figura 13 - Dosagens dos níveis de ureia em mg/dL efetuadas em hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61-VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de <i>L.major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61-VG (Pep+ISA).....	39
Figura 14 - Dosagens dos níveis de creatinina em mg/dL efetuadas em hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61-VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de <i>L.major</i> associado ao adjuvante Montanide ISA-61-VG (Pep+ISA).....	40
Figura 15 - As dosagens dos níveis de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) em UI/L efetuadas em hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de <i>L. major</i> associados ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Pep+ISA).....	42
Figura 16 - As dosagens dos níveis de FA (Fosfatase Alcalina) efetuadas em hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de <i>L. major</i> associados ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Pep+ISA).....	43
Figura 17 - Nível de anticorpo igG anti- <i>Leishmania</i> , nos diferentes grupos experimentais: controle (C), adjuvante (ISA) e vacina (Pep+ISA). Os resultados estão sendo expressos como densidade óptica (D.O). Cada barra representa dados agrupados (média ± desvio padrão) de três hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> )......	46
Figura 18 - Resposta linfoproliferativa de células do baço de hamsters nos diferentes grupos experimentais (controle, ISA e Pep+ISA) obtido através do ensaio ELISA após estimulação com antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i> (CE-ASLi) e peptídeo sintético de <i>Leishmania major</i> (CE-Pep). A proliferação é representada como a densidade óptica (D.O). Cada barra representa dados agrupados (média ± desvio padrão) de três hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> )......	48
Diagrama 1 - Esquema do delineamento experimental utilizado para a administração via cutânea dos inóculos em três doses vacinais com intervalos de 14 dias.....	32

# 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar neo-tropical, transmitida no Brasil por fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, é uma doença sistêmica crônica grave com ampla distribuição geográfica, podendo ser fatal na ausência de tratamento. Causada pelas espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi* é considerada endêmica principalmente em regiões de pobreza (Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil) (DESJEUX, 2004; MICHALICK, 2004; GRIESVEN e DIRO 2012; MONTALVO et al., 2012).

O ciclo de vida do parasito inicia-se no momento do repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea, onde as formas promastigotas metacíclicas são transmitidas ao hospedeiro invadindo os macrófagos. As promastigotas se diferenciam em formas amastigotas e se multiplicam por divisão binária até que ocorra o rompimento da célula infectada e as amastigotas sejam liberadas. Quando o *L. longipalpis* pica o hospedeiro infectado, ingere formas amastigotas que se diferenciam em promastigotas dando continuidade ao ciclo (REY, 2001; SILVA, 2008)

Os canídeos são considerados como sendo o principal reservatório da doença, devido ao contato regular com o homem e por muitas vezes apresentar diferentes sintomatologias clínicas que variam de um estado aparentemente sadio até um estado terminal (MADEIRA et al., 2004).

Dados epidemiológicos relatam que a LV apresenta uma incidência mundial de 500 mil casos/ano, com mais de 55.000 óbitos anualmente (DESJEUX, 2004; NUNES et al., 2008; DA SILVA et al., 2010). No Brasil, é consenso na comunidade científica a necessidade de uma vacina capaz de quebrar o ciclo de transmissão da *Leishmania infantum* no reservatório canino, visando à redução de incidências de casos em humanos. Contudo, o desenvolvimento de vacinas tem sido difícil pela complexidade do ciclo de vida e variabilidade antigênica de *Leishmania* spp. Devido a estas e outras variáveis, as tentativas para produzir vacinas seguras e eficazes contra *Leishmania* para cães ainda não alcançou o sucesso desejado (GRADONI et al., 2001; MAROLI et al., 2010).

Uma nova abordagem na produção de vacinas é a utilização de peptídeos sintéticos capazes de induzir imunidade por células-T, desencadeada pela apresentação do antígeno via MHC I ou MHC II. Baseada em vacinologia reversa,

vêm como um forte candidato para se incrementar a imunogenicidade e consequentemente os níveis de proteção contra leishmaniose, devido à facilidade de produção em larga escala, serem quimicamente estáveis e livre de contaminantes (VAN DER BURG et al., 2006; JACKSON et al., 2006).

Dentre os diversos possíveis candidatos vacinais contra a doença, temos o complexo lipofosfoglicano (LPG), expresso na forma flagelada do parasito, e a metaloproteinase gp63 (MICHALICK, 2004). A gp63, uma das moléculas mais abundantes na superfície da membrana do parasito, com 63kDa e com genes de identidade altamente conservada, é identificada como um dos fatores de virulência e patogenicidade do parasito, sendo caracterizada na superfície de diferentes *Leishmania* spp., por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (CUERVO et al., 2008). Conhecida também como PSP (promastigote surface protease), metaloproteinase ou leishmanolisina, tem capacidade para degradar diversos substratos como caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (YAO et al., 2003).

Segundo a literatura, um paciente imunizado com epítomos desta molécula pode apresentar memória em seu sistema de defesa após o primeiro contato, uma vez que após serem processados no interior dos macrófagos, os antígenos associados ao MHC de classe I ou MHC de classe II são expressos às células TCD 8+ ou TCD 4+ respectivamente, estimulando respostas celular e/ou humoral (MACHADO et al., 2004a; REIS et al., 2006).

De acordo com os órgãos oficiais de saúde, testes de vacinas devem obedecer a várias fases de estudo, começando com a Fase I (comparação entre indivíduos vacinados e placebos para avaliar a segurança de candidatos imunobiológicos) até Fase IV, com base na monitorização após a comercialização do produto como parte de campanhas nacionais de imunização (WHO, 2010). Nesse processo, destacam-se os estudos de Fase I, que envolve testes de inocuidade e toxicidade, bem como os de Fase II, com o objetivo de verificar a segurança e proteção preliminar potencialmente induzida pela vacina.

Neste sentido, o presente estudo teve por finalidade avaliar a resposta imune humoral e celular de hamsters (*Mesocricetus auratus*) por meio de um novo candidato vacinal heterólogo contra leishmaniose visceral (LV) constituído de dois peptídeos sintéticos da protease gp63 de *Leishmania major*, com elevada predição para MHC-I e II.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose

#### 2.1.1 O agente etiológico e morfologia do parasito

A leishmaniose é uma doença zoonótica vetorial causada por várias espécies de *Leishmania*, um protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, que se apresenta basicamente de duas formas principais: promastigota e amastigota (MICHALICK e GENARO, 2004).

As promastigotas, encontradas no trato digestivo do inseto vetor, são caracterizadas pela sua forma alongada e presença de um flagelo livre na porção anterior da célula, enquanto as formas amastigotas, parasitas de células fagocitárias, possui um aspecto arredondado, com flagelo curto não exteriorizado, conforme mostra a Figura 1 (GONTIJO e CARVALHO, 2003; MICHALICK e GENARO, 2004; CFSPH, 2009; WHO, 2016).

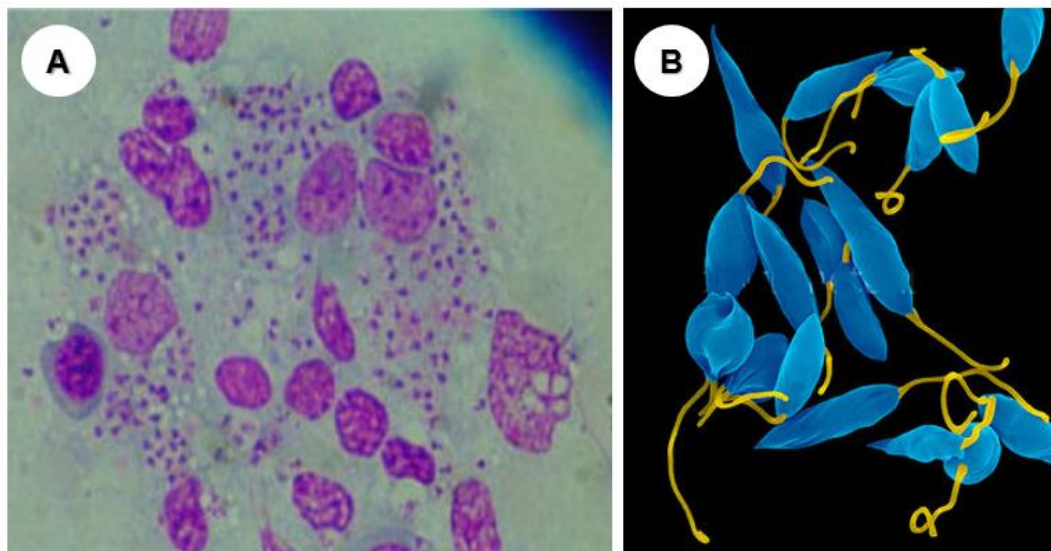


Figura 1 – Formas morfológicas da *Leishmania* spp. (A) amastigota e (B) promastigotas. (Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY; CAMARGO E LANGONI, 2006)

De acordo com suas manifestações clínicas e espécie infectante, a leishmaniose pode ser dividida em quatro categorias: muco-cutânea, cutânea-difusa, cutânea e visceral. Essas por sua vez, são classificadas no Brasil em dois grupos:

Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral Americana (DESJEUX, 2004).

A leishmaniose tegumentar (LT) pode causar feridas crônicas na pele e lesões desfigurantes das mucosas. No Brasil, as espécies causadoras da leishmaniose tegumentar são *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*, enquanto que no Oriente Médio, Ásia central e no Norte da África, as espécies *L. major* e *L. tropica*, destacam-se como principais causadoras da doença (SHARMA e SINGH, 2008).

A leishmaniose visceral (LV), considerada como a forma mais grave da doença, pode evoluir para uma infecção sistêmica e ser fatal se não tratada (HERWALDT, 1999). É caracterizada por febre irregular, perda de peso, dores abdominais, diarreia, tosse, anemia, linfadenopatia, pancitopenia, caquexia, entre outros (GUERIN et al., 2002; DESJEUX, 2004; PISCOPO e MALLIA, 2007). Causada pelas espécies *Leishmania chagasi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (MAURICIO et al., 2000; KUHLS et al., 2005), a LV foi relatada primeiramente na Grécia, em 1835, quando então era conhecida como “ponos” ou “hapoplinakon”, passando a ser chamada de calazar por médicos indianos no ano de 1869 (MARZOCHI et al., 1981).

No Brasil, o agente responsável pela doença é a *L. chagasi*, muitas vezes encontrada em países do Mediterrâneo e da Ásia como uma espécie semelhante à *L. infantum*, que a partir de técnicas bioquímicas e moleculares passaram a ser consideradas uma única espécie (GONTIJO e MELO, 2004; CAMARGO et al., 2007; CFSPH, 2009).

### **2.1.2 Epidemiologia e Distribuição**

Considerada como umas das seis mais importantes endemias do mundo, a leishmaniose tem prevalência em regiões tropicais e subtropicais, tais como sul da Europa (bacia do Mediterrâneo), sudeste da Ásia, Oriente Médio, leste da África, norte da África-Eurasia, e Américas (MICHALICK, 2004; MS, 2014; SÁNCHEZ-SALDAÑA et al., 2014; WHO, 2016).

Atualmente, cerca de 400 milhões de pessoas vivem em regiões endêmicas com uma estimativa de 0,9 – 1,3 milhões de novos casos/ano e mais de 12 milhões de pessoas infectadas/ano em 88 países, das quais 1-1,5 milhão desenvolvem a

forma tegumentar e 0,5 milhão a forma visceral (MURRAY et al., 2005; SÁNCHEZ-SALDAÑA et al., 2014; WHO, 2016).

Nos dias de hoje, a LV acomete cerca de 65 países, com aproximadamente 90% dos casos ocorrendo em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (GONTIJO e MELO, 2004). No Brasil, em 2015, a LV foi notificada em 22 dos 27 estados brasileiros. O estado do Tocantins apresentou uma taxa de incidência para cada 100 mil habitantes de 12,2, uma incidência muito superior aos dos estados da região Nordeste, onde ocorreu aproximadamente 51% do número total de óbitos por leishmaniose do país, conforme mostra a Tabela 1 (BRASIL, 2016).

Tabela 1 – Situação epidemiológica de Leishmaniose Visceral em 2015, no Brasil.

Região e UF	Casos confirmados	Coefficiente de Incidência	Letalidade	Óbitos
<b>Norte</b>	469	2,7	6,4	31
Roraima	11	2,2	6,3	1
Pará	273	3,3	5,0	14
Tocantins	185	12,2	8,4	16
<b>Nordeste</b>	1.806	3,2	7,3	138
Maranhão	539	7,8	6,9	39
Piauí	213	6,6	3,9	9
Ceará	419	4,7	8,4	37
Rio Grande do Norte	50	1,5	9,6	5
Paraíba	38	1,0	12,8	5
Pernambuco	123	1,3	8,9	11
Alagoas	43	1,3	4,7	2
Sergipe	61	2,7	16,7	11
Bahia	320	2,1	5,6	19
<b>Sudeste</b>	538	0,6	8,8	52
Minas Gerais	418	2,0	8,9	40
Espírito Santo	6	0,2	-	-
Rio de Janeiro	5	-	-	-
São Paulo	109	0,2	9,3	12
<b>Sul</b>	1	-	-	-
Paraná	4	-	-	-
Rio Grande do Sul	1	-	-	-
<b>Centro-Oeste</b>	157	1,0	8,7	15
Mato Grosso do Sul	95	3,6	8,3	9
Mato Grosso	29	0,9	10,3	3
Goiás	30	0,5	6,3	2
Distrito Federal	3	0,1	33,3	1
<b>Total</b>	3.289	1,6	7,8	272

Nota: \*As regiões estão em negrito seguidas somente dos estados onde foi notificada a leishmaniose. \*\*Os dados iguais a 0,0 (zero) foram substituídos por - (traço). (Fonte: ADAPTADO DE BRASIL, 2016).

### 2.1.3 Vetor e Transmissão

As diferentes formas da leishmaniose são transmitidas entre animais silvestres ou de animais silvestres e domésticos para o homem pela picada da fêmea de um vetor infectado, o qual é denominado flebotomíneo (Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*). (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; GONTIJO e MELO, 2004; MICHALICK, 2004; MS, 2014).

Os flebotomíneos estão divididos em seis gêneros. Destes, apenas dois são de importância médica: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Figura 2). São comumente encontrados em áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas. No Brasil, são popularmente conhecidos como mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outras denominações (ROSYPAL et al., 2003; MICHALICK e GENARO, 2004).



Figura 2 – Inseto vetor (*Lutzomyia longipalpis*) exercendo hematofagia. (Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY).

### 2.1.4 Ciclo biológico

O ciclo biológico da leishmaniose visceral é realizado em dois hospedeiros: um vertebrado (mamíferos – cães, homem) e um invertebrado (vetor) (LAINSON e SHAW, 1987). No homem, a infecção ocorre no momento da picada. Durante a ingestão de sangue, o inseto infectado inocula formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro, que são reconhecidas por células do sistema imune (células dendríticas, fibroblastos, neutrófilos e, principalmente, macrófagos) e fagocitadas formando o fagolisossomo. No interior do vacúolo, as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas e se replicam por divisão

binária no interior das células fagocíticas. Com a replicação, as amastigotas são liberadas ao meio extracelular com a lise do macrófago infectado, possibilitando a infecção de novas células do sistema imune e de uma nova fêmea do flebotomíneo no momento do repasto sanguíneo (BAILEY e LOCKWOOD, 2007; SERENO et al., 2007).

Para que a doença se desenvolva no hospedeiro, fatores como a quantidade de parasitos inoculados durante o repasto sanguíneo, sua infectividade e virulência e a presença de componentes vasodilatadores, anti-inflamatórios e imunomoduladores encontrados na saliva do vetor devem ser levados em consideração (ROSYPAL et al., 2003; ANDRADE et al., 2007; OLIVIER et al., 2012).

Quando a fêmea pica um hospedeiro infectado, ingere células parasitadas com formas amastigotas que no intestino do vetor transformam-se em promastigotas procíclicas, sua forma replicativa. As promastigotas procíclicas passam então por um processo de metaciclogênese, onde apresentam mudanças bioquímicas como a redução de tamanho do corpo celular e aumento do flagelo, além de expressar moléculas como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63 em sua superfície celular, passando assim a ser denominada promastigotas metacíclica, sua forma infectiva (OLIVIER et al., 2012; PIMENTA et al., 2012). As formas metacíclicas se direcionam para a prosbóscide do inseto e são introduzidas em um novo hospedeiro através do repasto, dando continuidade do ciclo (Figura 3) (MEDINA-ACOSTA et al., 1989; DESCOTEAUX e TURCO, 1999; HERWALDT, 1999; MS, 2014).

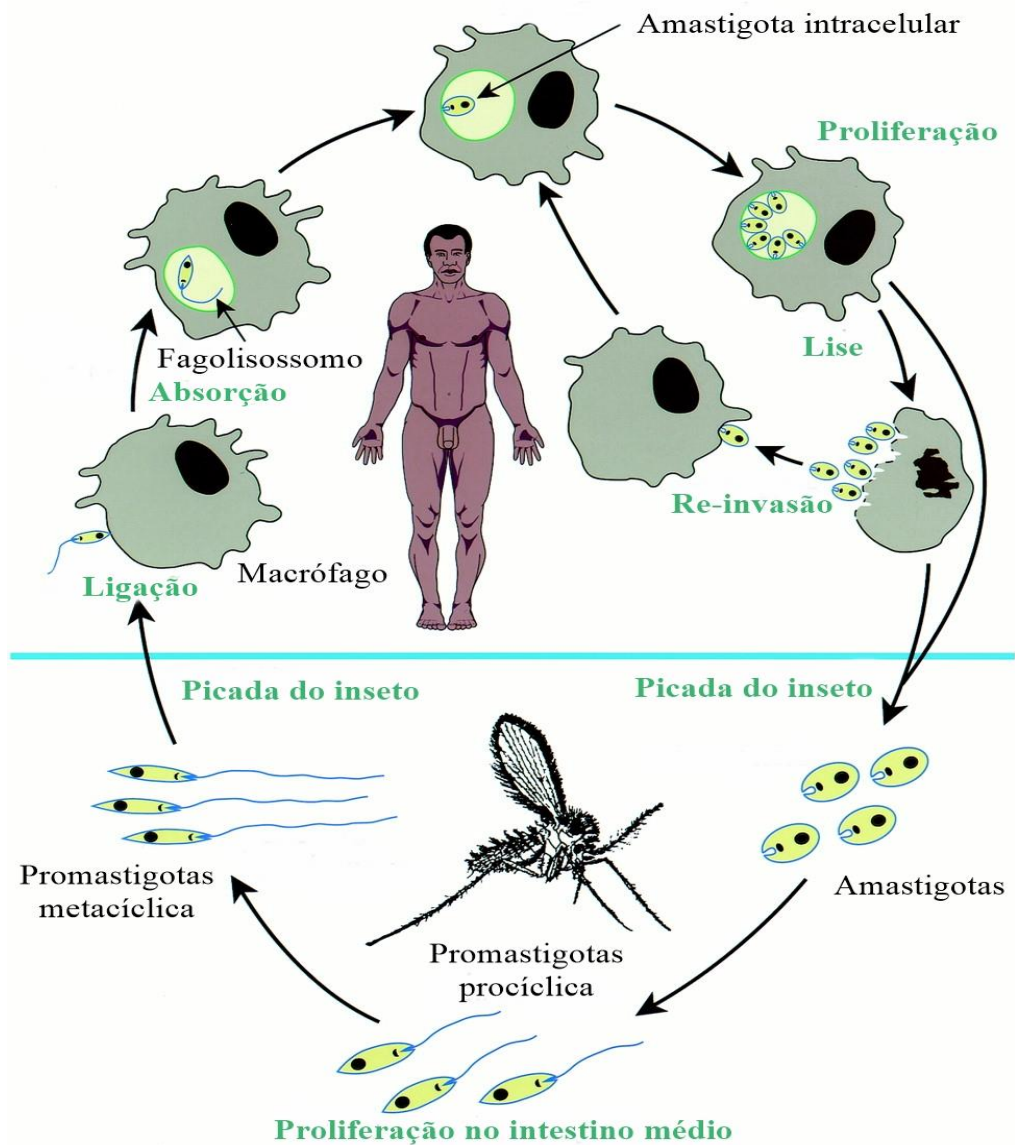


Figura 3 - Ciclo biológico da *Leishmania* sp. no hospedeiro mamífero e no vetor. (Fonte: ADAPTADO DE HANDMAN, 2001).

### 2.1.5 Reservatórios

Os canídeos, sejam eles silvestres ou domésticos, são considerados os principais reservatórios da LV para o homem. Nesta família de mamíferos incluem a raposa (*Cerdocyon thous*) encontradas com maior frequência nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Amazônia e os cães (*Canis familiaris*) encontrados em todos os focos de doença humana (Figura 4). Devido à proximidade do cão e do homem no ambiente doméstico, os cães são considerados o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (MICHALICK e GENARO, 2004).

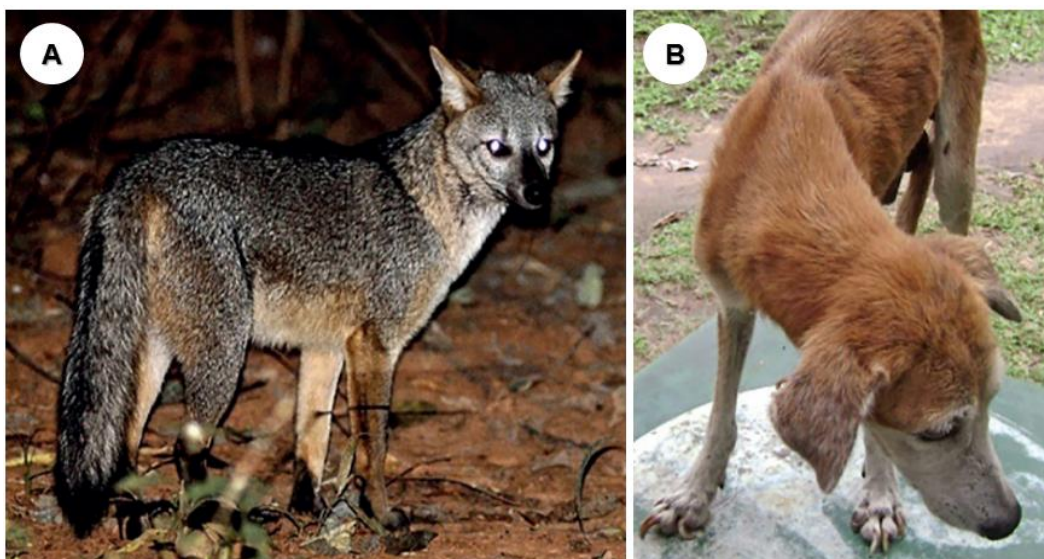


Figura 4 – Principais reservatórios da LV. (A) raposa (*Cerdocyon thous*); (B) cão (*Canis familiaris*). (Fonte: SILVEIRA et al., 2016).

Na LVC (leishmaniose visceral canina) o cão desenvolve a LV de forma análoga à doença humana, apresentando diversos sinais clínicos típicos, como intenso parasitismo cutâneo, alterações clínicas na pele, anemia, leucopenia, caquexia, entre outros (CIARAMELLA et al., 1997).

Com a descoberta de que a LV humana e canina são causadas pelo mesmo agente, diversos pesquisadores têm voltado seus estudos ao tratamento da LVC, uma vez que para controlar o desenvolvimento da leishmaniose, é necessário que as medidas de controle da LV atuem no cão. Dessa forma, torna-se fundamental o estudo e a descoberta de terapias e/ou vacinas eficazes em cães (WHO, 2010).

Diante disso, destaca-se a importância da utilização de modelos experimentais que apresentem um quadro clínico-patológico semelhante à doença ativa observada tanto no homem, quanto no cão, que possa contribuir com estudos terapêuticos e de imunoprevenção contra a LV (PEARSON e ROBERTS, 1990).

Dentre os modelos experimentais normalmente utilizados, o hamster (*Mesocricetus auratus*) se destaca por sua capacidade de propiciar informações importantes acerca da manutenção de parasitos, seus ciclos biológicos e da relação parasito-hospedeiro (PEARSON e ROBERTS, 1990).

### **2.1.6 A interação parasito-hospedeiro**

A relação parasito-hospedeiro é a variável mais importante a ser levada em consideração quando se pretende avaliar se uma infecção será bem estabelecida pelo patógeno ou debelada pelo hospedeiro (DE MORAIS et al., 2015). Diversos mecanismos fisiológicos tanto do agente patogênico quanto do hospedeiro estão envolvidos nessa interação.

No caso dos parasitos do gênero *Leishmania* que apresentam mecanismos evasivos, a interação com o hospedeiro se dá devido, principalmente, à variedade de moléculas existentes na sua superfície, as quais são utilizadas para modular a resposta celular e assim, ingressar na célula hospedeira (MEDINA-ACOSTA et al., 1993a; YAO et al., 2003; REIS et al., 2006; DE MORAIS et al., 2015).

A gp63 é considerada como uma das moléculas mais abundantes encontradas na superfície de todas as espécies de *Leishmania*. Quando a forma promastigota metacíclica invade o hospedeiro, a protease gp63 protege o parasito da lise mediada pelo sistema do complemento e facilita a fagocitose pelo macrófago do hospedeiro. A gp63 atua inativando o componente C3b livre em C3bi e interrompe a formação do produto final do complemento, o complexo de ataque à membrana (MAC). Os componentes C3bi e C3b, que se aderem à membrana do parasito, atuam como opsoninas, pois se ligam aos receptores CR3 e CR1 do macrófago, facilitando a fagocitose do promastigoto (BRITTINGHAM, 1995; YAO et al., 2003; GENARO, 2004). A glicoproteína gp63 das formas amastigotas, já no interior da célula, tem a capacidade de degradar as enzimas lisossomais, pois possui atividade ótima nas condições ácidas do fagolisossomo. (CUNNINGHAM et al., 2002).

### **2.1.7 Resposta imunológica do hospedeiro**

A infecção parasitária pode desencadear uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de linfócitos T e um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (REIS et al., 2006). É válido ressaltar que a indução das subpopulações (Th1 ou Th2) de linfócito Th (*T helper*) é dependente de diversos fatores, tais como: a dosagem infectante, via de inoculação, mecanismos de apresentação pelas APCs (células apresentadoras de antígeno) bem como pela variabilidade genética do hospedeiro (MICHALICK e GENARO, 2004).



De maneira geral, os linfócitos T reconhecem antígenos somente quando processados e acoplados a moléculas de MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC). Dependendo da localização do antígeno podem atuar duas classes de MHC (MHC-I e MHC-II). Se presentes no citosol das células os antígenos serão processados por proteassomas e ligados ao MHC-I formando o complexo antígeno-MHC, que ao se apresentar na superfície da célula será reconhecido pelos linfócitos T CD8+ citotóxico desencadeando uma resposta Th1, caracterizada principalmente pela produção de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, quando fagocitados, os antígenos são degradados no interior de vesículas e acoplados ao MHC de classe II. Assim, ao se expressarem na superfície celular serão reconhecidos pelos linfócitos TCD4+ auxiliar, que secretam citocinas de acordo com seu padrão de diferenciação (Th1, Th2 e Th17) (Figura 5) (FREITAS e PINHEIRO, 2010; ABBAS et al., 2011).

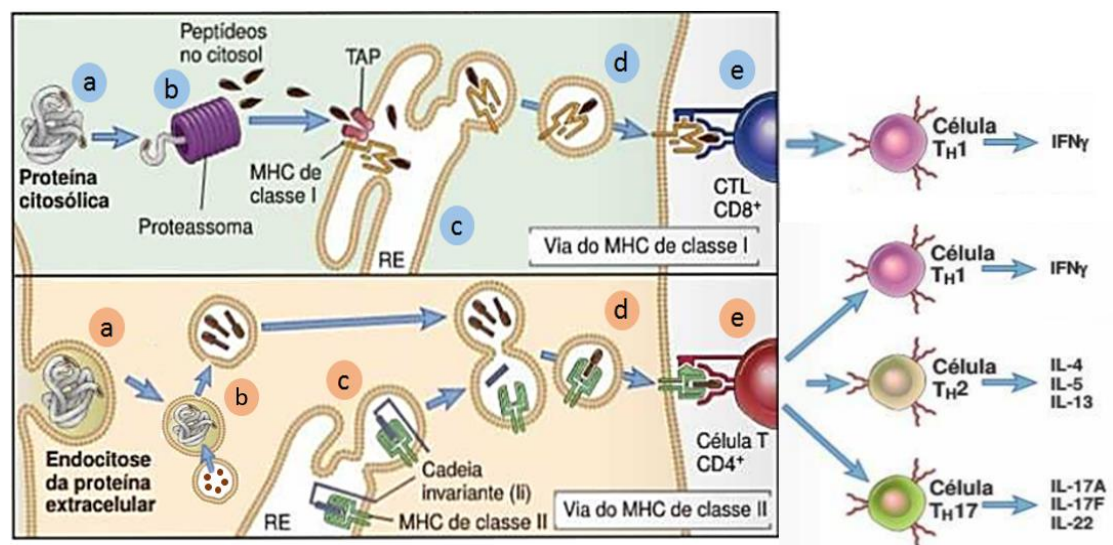


Figura 5 – Vias de processamento e apresentação de antígeno. (a) captação do antígeno; (b) processamento do antígeno; (c) biossíntese do MHC; (d) formação do complexo peptídeo-MHC; (e) expressão dos complexos de peptídeo-MHC na superfície. (Fonte: ABBAS et al., 2011).

Segundo ALCOLEA et al., (2016), a imunidade contra *Leishmania* spp. tem sido relatada como sendo dependente da resposta auxiliar T (linfócitos TCD4+) desencadeada pela apresentação de antígeno via MHC de classe II, com produção de citocinas características de Th1, enquanto que o processo progressivo da doença está associado a uma resposta do tipo 2 (Th2), caracterizada pela produção de

grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10), que inibem macrófagos favorecendo a infecção intracelular (GHOSH et al., 2006; REIS et al., 2006; FREITAS e PINHEIRO, 2010; ABBAS et al., 2011; PRAJEETH et al., 2011; ).

## **2.2 Desenvolvimento de vacinas a partir da bioinformática**

A identificação de epítomos capazes de gerar uma resposta imune protetora representa o entrave mais significativo na produção de vacinas contra qualquer agente patogênico devido ao custo financeiro, tempo e diversidade de dados proteômicos. Diante disso, uma nova estratégia, denominada vacinologia reversa, vêm sendo adotada com o intuito de quebrar este entrave, reduzindo, assim, o custo das pesquisas e o tempo de identificação de novos candidatos vacinais por meio da busca de epítomos *in-sílico* (ADU-BOBIE et al., 2003; HEINSON et al., 2015; SINGH et al., 2015;).

A vacinologia reversa tem partida da sequência genômica do patógeno, e por ferramentas de bioinformática (SYFPEITHI, TriTrypDB, IEDB, NETMHC, SVMHC, entre outros) prediz os antígenos que são mais susceptíveis de serem candidatos vacinais, ou seja, aqueles que promovem resposta imunológica ao hospedeiro quando reconhecidos por linfócitos T (MORA et al., 2003; FERREIRA e PORCO, 2008). Uma vez identificados os possíveis epítomos, a sequência de aminoácidos é sintetizada por métodos químicos, enzimático ou com a tecnologia do DNA recombinante. Cada técnica tem suas vantagens, no entanto, a metodologia química de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é mais utilizada devido à combinação entre velocidade e praticidade, principalmente, para obtenção de peptídeos curtos. Na SPFS, o peptídeo desejado é alongado sobre um suporte polimérico insolúvel aonde vão se ligando sequencialmente os aminoácidos (MERRIFIELD, 1963; NILSSON et al., 2005; CHANDRUDU et al., 2013). Após finalizados, os peptídeos são analisados, purificados, caracterizados quimicamente e então inoculados em animais experimentais para avaliar sua imunogenicidade e capacidade de induzir proteção (ADU-BOBIE et al., 2003).

## **2.3 Vacinas de peptídeos sintéticos**

Nos últimos anos, uma grande variedade de peptídeos biologicamente ativos têm sido sintetizados por métodos químicos ou enzimáticos, com o intuito de serem

utilizados como potenciais candidatos vacinais. Geralmente, corresponde a fragmentos provenientes de sequência de proteínas antigênicas específicas, capazes de induzir à resposta imune protetora. Esta resposta imunitária pode envolver células T ou células B (MACHADO et al., 2004b; MOISA e KOLESANOVA, 2010).

Ao contrário das vacinas tradicionais, as vacinas constituídas de peptídeos sintéticos apresentam como vantagem o fato de possuir uma caracterização química definida, ausência de material infeccioso, alto grau de pureza e possibilitar a produção em larga escala (PATARROYO et al., 2002; JACKSON et al., 2016). Apesar dessas vantagens, os peptídeos sintéticos possuem como limitação o baixo poder imunogênico, pois apresentam, em sua maioria, cadeias lineares curtas, sem a conformação terciária ou quaternária normal do epítopo, dificultando o reconhecimento pelos linfócitos e tornando-os mais susceptíveis a degradação pelas peptidases (CANAL e VAZ, 2012). Essas características fazem com que as vacinas de peptídeos necessitem, em sua formulação, de substâncias adicionais conhecidas como adjuvantes, para auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune semelhante à infecção natural (MOTA et al., 2006; MOISA e KOLESANOVA, 2010; KENNETH, 2014).

Uma abordagem alternativa, envolve a utilização da família Montanide™ ISA. Um conjunto de adjuvantes formulados à base de óleo, capazes de estimular a imunogenicidade de antígenos proteicos, recombinantes e sintéticos (MOHAN et al., 2013). As propriedades imuno-ativadoras destes adjuvantes envolvem a formação de um depósito do antígeno, no local da inoculação (início da inflamação), que por sua vez atrai as células imunitárias para o local da injeção, onde o antígeno é apreendido na sua forma solúvel (SILVA et al., 2015).

Entre os diferentes tipos de Montanide™ ISA, podemos citar o ISA61VG. Um adjuvante desenvolvido pela SEPPIC, com resposta imunitária de alto potencial (KHORASANI et al., 2016). Segundo o fabricante, a emulsão de água em óleo (W/O) Montanide ISA61VG é especialmente adequada para vacinas com antígenos de baixa imunogenicidade, como o caso das vacinas peptídicas, induzindo uma resposta imune protetora a longo prazo. Além disso, são consideradas emulsões estáveis de baixa viscosidade, o que facilita o processo de injeção (SEPPIC, 2017).

## 2.4 Hamster como modelo de progressão clínica

Nos dias de hoje, o desenvolvimento de vacinas contra infecções por protozoários ainda são um grande desafio. As metas para o desenvolvimento de vacinas incluem a descoberta de bons candidatos, avaliação sistemática das vacinas em modelo murino tentando estabelecer correlações entre resposta imune e proteção, e mais importante, validar os resultados obtidos em modelos não isogênicos (RAMIRO et al., 2003; RAFATI et al., 2005; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2007; BORJA-CABRERA et al., 2008; MAROLI et al., 2010).

Embora ainda não se tenha muitos reagentes e anticorpos específicos para os hamsters, a possibilidade de avaliação imunológica por meio de abordagens moleculares alternativas tem mantido a preferência por esses animais. Os hamsters são modelos experimentais de baixo custo devido a fácil manipulação e manutenção (MELBY et al., 2001), além de serem muito susceptíveis para os estudos de fármacos, mecanismos de imunossupressão e vacinas (BASU et al., 2005; GARG e DUBE et al., 2006).

No estudo experimental da leishmaniose, o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) têm sido considerado o modelo animal muito adequado, devido à capacidade de apresentar uma progressão da infecção no fígado, baço e medula óssea que levam a sinais clínico-patológicos semelhantes aos observados na doença em cães e humanos. Já os camundongos, comumente, apresentam poucos ou nenhum sinal da doença (ROUSSSEAU et al., 2001; ANDRADE et al., 2006; CARRIÓN et al., 2006; GARG e DUB, 2006; NIETO et al., 2011; LORÍA-CERVERA e ANDRADE-NARVÁEZ 2014).

Os infiltrados inflamatórios e os granulomas são as principais alterações histopatológicas observadas no fígado de hamsters dourados infectados com *Leishmania* visceralizantes, sendo que os granulomas estão relacionados com a resposta imune eficiente, a resolução da infecção aguda e a resistência a reinfeção do fígado pela *Leishmania* (MANGOUD et al., 1997; MELBY et al., 2001; VIANNA et al., 2002)

O baço também é acometido de alterações patológicas, se tornando um local de acúmulo do parasito da *Leishmania* na sua forma amastigota (DRUMOND e COSTA, 2011), no entanto, é o órgão inicial da resposta imune específica, mediada por células, contra este parasito (KAYE et al., 2004; PEREZ et al., 2006). Na fase

mais avançada da infecção em hamsters, o baço apresenta destruição da estrutura esplênica devido ao grande número de macrófagos parasitados e agregados na polpa vermelha, na região subcapsular (ENGWERDA et al., 2002; SANTANA et al., 2008).

Os hamstes dourados infectados por LV desenvolvem hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunodepressão. Sinais que estão relacionados com o grau de parasitismo da LV, titulação elevada de anticorpos e ausência de resposta linfoproliferativa. Estas características demonstram que os perfis dos biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e preservação se assemelham aos avaliados na leishmaniose humana e canina durante o curso natural da infecção (RIÇA-CAPELA et al., 2003).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Realizar o estudo preliminar de um novo candidato vacinal contra leishmaniose visceral utilizando a associação de dois peptídeos sintéticos da protease gp63 da *Leishmania major*, com predição para MHC-I e MHC-II.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- (i) Desenvolver uma formulação vacinal constituída de peptídeos ligantes a MHC-I e MHC-II obtidos por predição de bioinformática;
- (ii) Avaliar a toxicidade e inocuidade da formulação proposta, por meio da análise bioquímica e hematológica do sangue de hamsters *Mesocricetus auratus*;
- (iii) Avaliar a imunogenicidade do candidato vacinal por meio da reatividade sérica anti-*Leishmania* (anti-IgG total) e atividade linfoproliferativa;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no biotério da Universidade Federal do Tocantins e no Laboratório de Biomoléculas e Vacinologia (LabVac) em parceria com a UNESP E UFMG.

### 4.1 Desenho dos peptídeos

O desenho dos peptídeos foi feito por meio da predição de epítomos da gp63 da *L. major* (Figura 6) restritos ao MHC de classes I e II, utilizando e seguindo os procedimentos já pré-estabelecidos pelo *software* SYFPEITHI, de livre acesso na *World Wide Web* para a predição de qualquer peptídeo-HLA de ligação ou de proteassoma. As sequências de aminoácidos dos peptídeos não serão mencionadas devido ao depósito de patente já estar previsto.

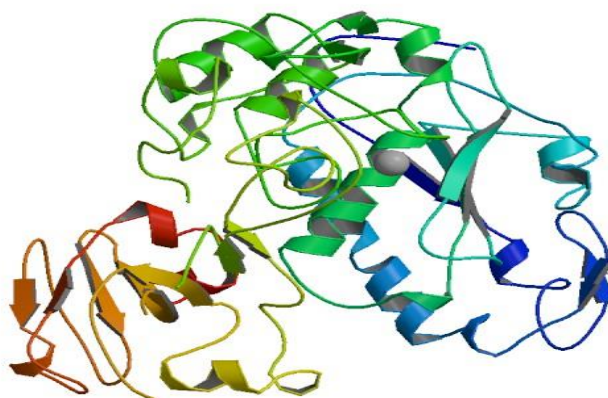


Figura 6 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp63 da *Leishmania major*. (Fonte: PROTEIN DATA BANK, 2016).

### 4.2 Síntese química dos peptídeos

A síntese dos peptídeos foi realizada usando a metodologia da fase sólida, conforme o protocolo padrão (MERRIFIELD, 1963), no qual usa o grupo base-lábil 9-Fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como protetor dos grupos  $\alpha$ -amino e derivados t-butílicos (t-Bu) para as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. Foi utilizado ainda Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de condensação.

Para o acoplamento de cada aminoácido utilizou-se para o Fmoc-aminoácido e para os agentes de condensação, uma concentração molar 3 vezes maior em relação à quantidade de resina de partida. Depois da entrada de cada aminoácido, o grupo Fmoc foi retirado dos grupos  $\alpha$ -amínicos aplicando-se uma solução de piperidina 20% (v/v) em Dimetilformamida (DMF). O monitoramento da eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi realizado usando o teste ninidrina (KAISER et al., 1970), sendo que quando positivo o processo foi repetido empregando a metade (50%) da concentração inicial dos reagentes.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi realizada utilizando o tratamento das peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,0%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (1,0%), à temperatura ambiente por um período de 2 horas. Os peptídeos brutos foram precipitados e lavados com éter etílico gelado, sendo posteriormente retidos em funil de placa porosa para serem eluídos em água e em seguida liofilizados. Subsequente, uma fração da massa do extrato bruto de cada peptídeo liofilizado foi dissolvida em solvente A (água + TFA 0,04%), até a completa solubilização do material bruto.

### **4.3 Purificação e identificação dos peptídeos**

Para a purificação dos peptídeos utilizou-se a cromatografia líquida sob condições de baixa pressão, coluna de fase reversa e gradiente de acetonitrila (5 a 95%). As frações obtidas foram analisadas por CLAE. Em seguida o conteúdo dos tubos contendo o peptídeo foi unido e liofilizado e, para confirmar sua pureza, novamente avaliado por CLAE. A identidade química dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas.

### **4.4 Animais**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Nº 288/2013 (Apêndice 1). Nove animais de ambos os sexos foram selecionados de forma aleatória entre espécies de *M. auratus* com idade de 4-8 semanas. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Federal do Tocantins em gaiolas de plástico revestidas com maravalha, recebendo ração como suprimento alimentar e água potável.



#### 4.5 Delineamento e protocolo experimental

Para inoculação das doses vacinais, foram utilizadas distintas seringas de insulina (1mL) estéreis. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, cada grupo contendo três animais (n=3). No primeiro grupo, nomeado como controle, cada animal recebeu 100  $\mu$ L de solução salina estéril a 0,85%. No segundo, designado adjuvante, foi administrado 30  $\mu$ L do adjuvante oleoso Montanide ISA-61VG diluído em 70  $\mu$ L de solução salina 0,85%. No terceiro e último grupo, onde foram inoculados os peptídeos e o adjuvante, cada animal foi imunizado com 30  $\mu$ L do peptídeo MHC-I + 30  $\mu$ L do peptídeo MHC-II, emulsionados em 30  $\mu$ L do adjuvante Montanide ISA-61VG e diluídos em 10  $\mu$ L de solução salina 0,85%. Os inóculos dos diferentes grupos experimentais foram administrados via subcutânea (Figura 7A) em três doses vacinais intervaladas de 14 dias. Todos os animais tiveram o sangue coletado após seis dias da terceira dose (Diagrama 1).

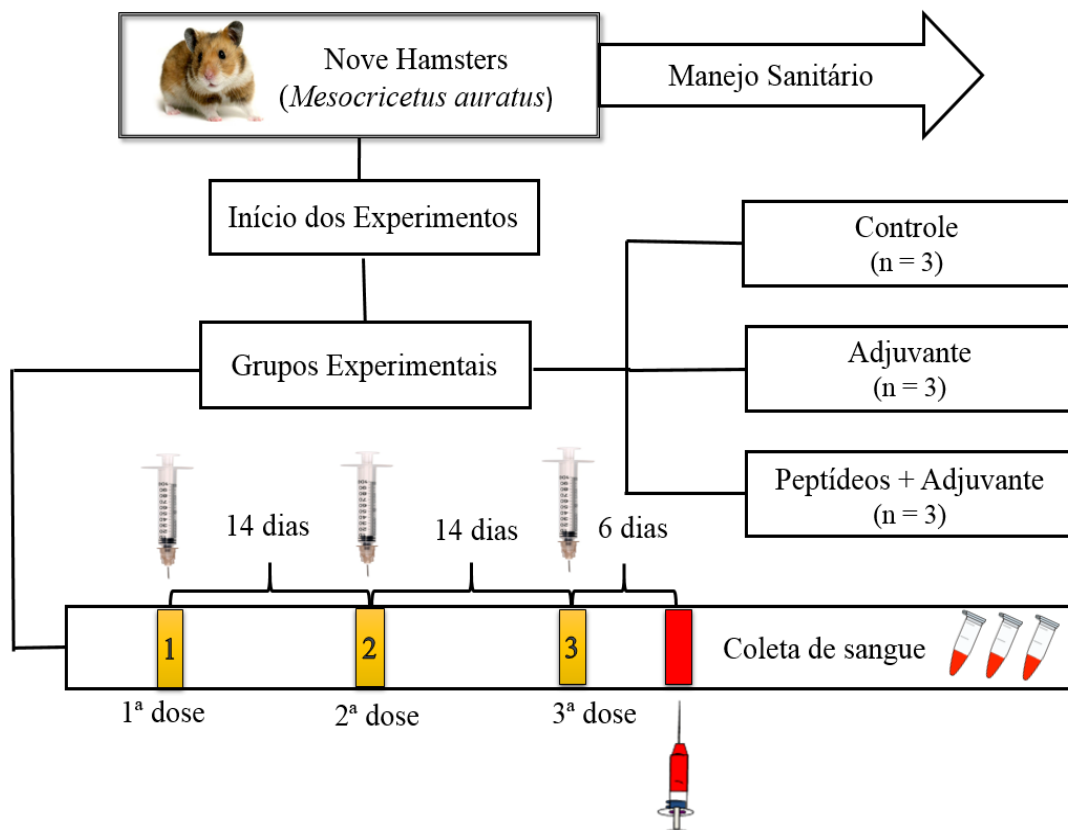


Diagrama 1- Esquema do delineamento experimental utilizado para a administração via cutânea dos inóculos em três doses vacinais com intervalos de 14 dias.

## 4.6 Obtenção de amostras de sangue

Após seis dias da última dose vacinal, os animais foram sedados com 0,2 mg/kg do anestésico Clortamina® (50mg/mL) por via intraperitoneal para realização da coleta de sangue. A coleta foi realizada utilizando seringas de insulina de 1mL, por meio de punção intracardíaca de 500  $\mu$ L de sangue (Figura 7B). Deste total, 50  $\mu$ L foram enviados para análises hematológicas, 10  $\mu$ L foram destinados à confecção dos esfregaços sanguíneos em lâminas para contagem diferencial de células e 440  $\mu$ L centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi acondicionado em freezer a -20 °C até que fosse utilizado para a realização das dosagens bioquímicas.



Figura 7 – (A) Administração dos inóculos por via subcutânea. (B) coleta de sangue através da punção intracardíaca.

## 4.7 Análise de inocuidade e toxicidade

### 4.7.1 Avaliação bioquímica

As avaliações bioquímicas para prova de função renal (dosagem de ureia e creatinina) e para provas de função hepática (dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA)) foram realizadas usando um sistema bioquímico automático (CELM SBA-200, Barueri, SP, Brasil) e *Kits* comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante.

#### 4.7.2 Avaliação hematológica

Para avaliar o perfil hematológico fez-se uma análise global de leucócitos utilizando o aparelho *Auto Hematology Analyzer* (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha), o qual fornece o número de leucócitos/mm<sup>3</sup>. As células foram contadas em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e analisadas por microscópio óptico com objetiva de imersão, o qual possibilitou determinar a quantidade diferencial de leucócitos e obter o número absoluto de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

#### 4.8 Sorologia para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

A determinação dos níveis de anticorpos igG, anti-*Leishmania* foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Seguindo o protocolo utilizado por Moreira (2012), inicialmente, 18 poços de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com 3 µL de cada antígeno solúvel de *L. major* (SLA) em 94 µL de solução de cobertura. Em seguida, a placa contendo 100 µL/poço da solução total foi deixada em over night. A placa sensibilizada foi lavada 4 vezes com solução de lavagem PBS-Tween 20 (Figura 8).

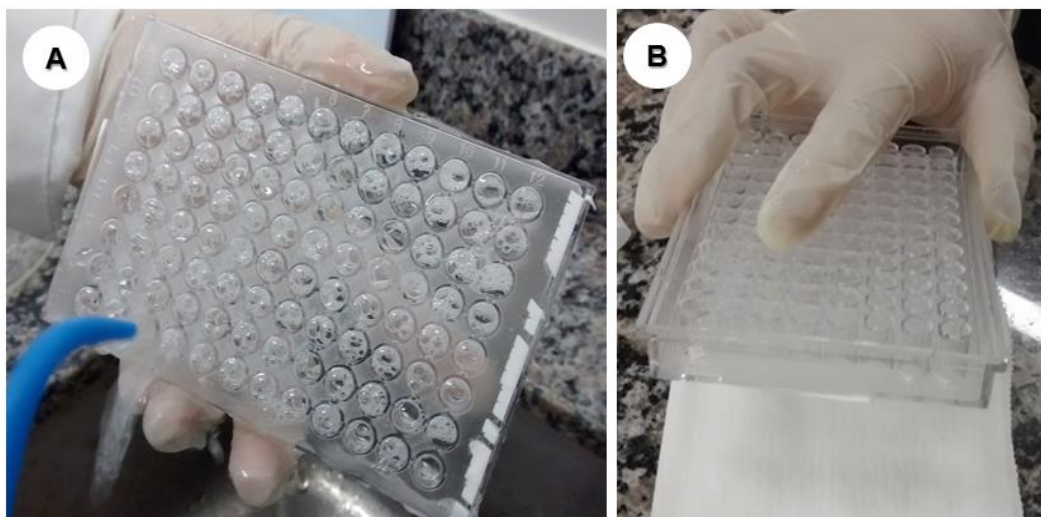


Figura 8 – Lavagem da placa com solução de PBS-tween 20. (A) Processo de lavagem (B) retirada do excesso de solução dos poços.

A seguir, as placas foram bloqueadas com 100µL/poço de uma solução contendo PBS e soro fetal bovino (SFB) 5%, durante 45 minutos, em uma estufa a

37°C, e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras de soros dos hamsters, de cada grupo avaliado, foram testadas na diluição de 1:40 (1 µL de soro + 40 µL PBS/TWEEN) e aplicados em um volume de 100 µL em cada poço da placa em triplicata, que foi em seguida coberta e incubada por 45 minutos por 37 °C. Após o período de incubação, a placa foi novamente lavada 4 vezes com solução de lavagem. A seguir, foi empregado o conjugado (com HRP) na concentração de 1:3000 (1 µL do Ac + 3000 µL PBS/TWEEN), adicionando em cada poço 100 µl da solução (Figura 9).

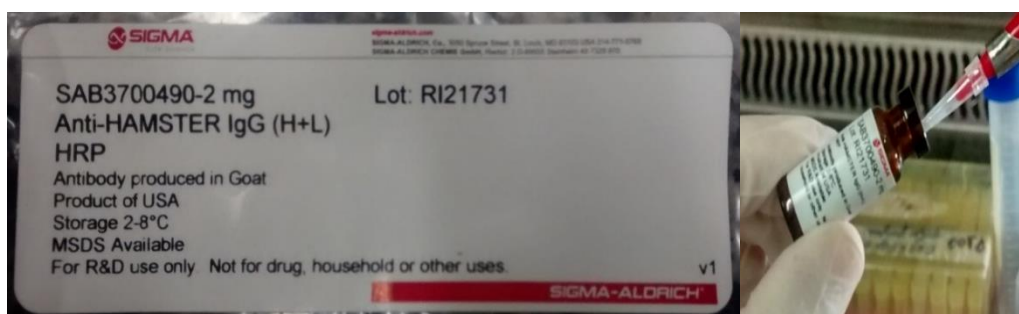


Figura 9 – Anticorpo Anti-Hamster produzido em cabra utilizado como marcador para determinar os níveis de anticorpos igG, anti-*Leishmania*.

Mais uma vez a placa foi incubada, ao abrigo da luz, durante 45 minutos e a uma temperatura de 37 °C. Após a incubação foi novamente lavada 4 vezes. Subsequente, foi adicionado o substrato TMB num volume de 100 µL/poço, seguido pela incubação da placa a 37 °C por 20 minutos. A seguir, foi adicionado 32 µL/poço da solução de parada ( $H_2SO_4$  2,5 M). A leitura foi realizada em leitor automático de microplaca POLARIS, utilizando o comprimento de onda de 490 nm (Figura 10).

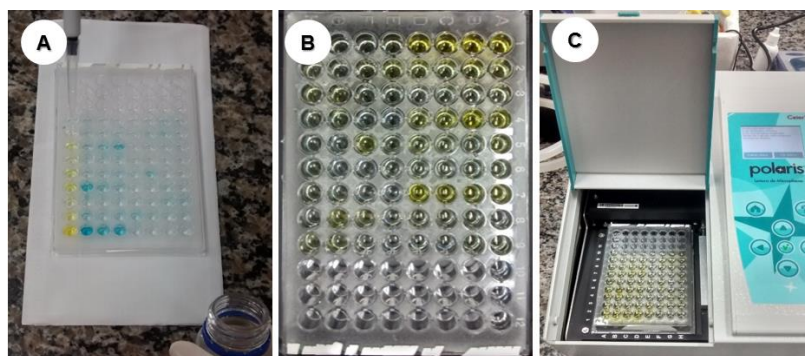


Figura 10 – (A) Adição da solução de parada ( $H_2SO_4$ ). (B) placa com todos os poços contendo  $H_2SO_4$ . (C) leitura da placa em um leitor automático.

#### 4.9 Linfoproliferação de esplenócitos

Após 211 dias da terceira dose vacinal, todos os animais foram eutanasiados. Dentro da capela de fluxo laminar os baços foram rapidamente coletados e separadamente colocados em provetas de 5 mL estéreis contendo 500  $\mu$ L de meio RPMI. Em seguida, os baços foram macerados, utilizando um bastão de vidro, e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 4 mL de meio RPMI (Figura 11).

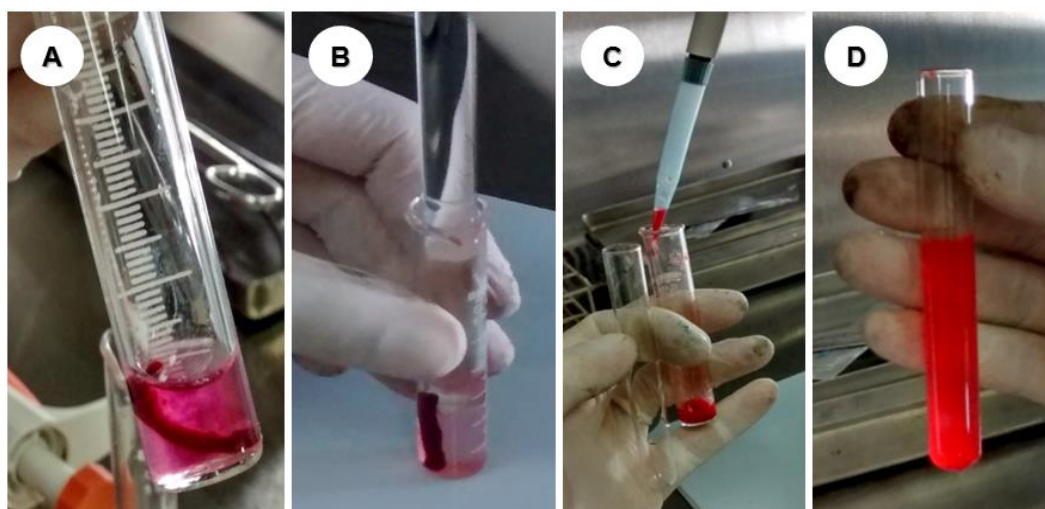


Figura 11 – Processo de obtenção de células do baço de hamster. (A) baço recém retirado dos hamsters. (B) maceração manual do baço utilizando um bastão de vidro. (C) transferência do sobrenadante para o tubo de ensaio após maceração. (D) tubo de ensaio com sobrenadante e meio RPMI.

A seguir, os tubos foram centrifugados a 1200 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao pellet 5 mL da solução de lise 1x, homogeneizando em intervalos de 3 minutos, durante 10 minutos, até completa dissolução. Os tubos foram novamente centrifugados a 1200 rpm durante 8 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 mL de meio RPMI e a solução homogeneizada. Posteriormente foi realizado o plaqueamento, utilizando duas placas de 96 poços com volume de 200  $\mu$ L. O plaqueamento da primeira placa (placa controle) foi feito em triplicata, adicionando em cada poço 50  $\mu$ L de células de cada animal e 150  $\mu$ L de meio RPMI. Na segunda placa, foi adicionando 50  $\mu$ L de células de cada animal com 1  $\mu$ L de cada peptídeo e 50  $\mu$ L de células de cada animal com 1  $\mu$ L do antígeno solúvel de *L. infantum*. Todos os poços

foram completados com meio RPMI até o volume de 200  $\mu$ L. Para as amostras celulares correspondentes aos animais que receberam a vacina, o procedimento foi feito em duplicata. A seguir, a placa foi coberta com plástico filme PVC e incubada por 72 horas a uma temperatura de 36°C. Após incubação, foi acrescentado 20  $\mu$ L de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) à concentração de 5 mg/mL e a placa foi incubada novamente durante 4 horas a 36°C. Decorrido este tempo, a placa foi retirada da estufa e o sobrenadante de cada poço aspirado cuidadosamente. Em seguida, os cristais de formazan foram homogeneizados com isopropanol ácido, até que fossem completamente dissolvidos. A leitura da absorbância, que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, foi realizada através do leitor de Elisa POLARIS, no comprimento de onda de 540 nm (Figura 12).

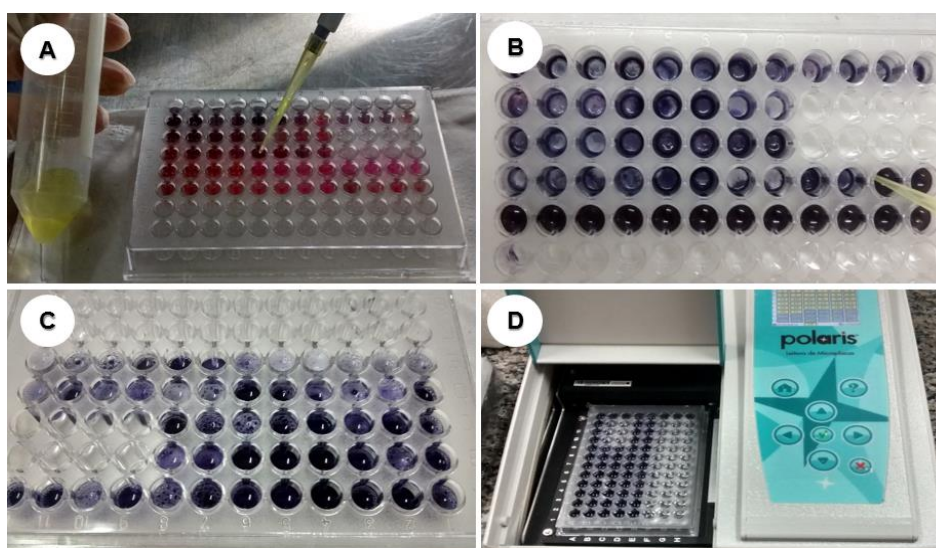


Figura 12 – Preparação da placa para determinar a quantidade de células viáveis. (A) Adição de MTT. (B) Aspiração do sobrenadante e visualização dos cristais de formazan. (C) homegeinização dos cristais de formazan. (D) leitura das absorbâncias a 540nm.

#### 4.10 Análise estatística

Para as análises estatísticas empregou-se o *software GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). Realizou-se a análise de variância (ANOVA) com posterior teste de *Tukey* a fim de determinar as diferenças particulares entre os grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com  $P < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise do quadro hematológico e bioquímico, são exames de grande importância para monitoramento do diagnóstico e prognóstico de doenças, assim como para avaliar se o uso de um medicamento ou vacina está tendo alguma ação lesiva e identificar sua gravidade (MOREIRA, 2012).

### **5.1 Bioquímica clínica**

Os testes bioquímicos são capazes de oferecer importantes informações a respeito do mal funcionamento renal e hepático decorrente de enfermidades, drogas e toxinas. Estes testes associados a dados sorológicos, permitem diagnosticar a existência de problemas orgânicos e avaliar o prognóstico de determinadas condutas terapêuticas em animais. (HAGIWARA, 2004).

#### **5.1.1 Função renal**

Os principais testes bioquímicos para o diagnóstico de comprometimento renal, incluem a dosagem sérica de ureia e creatinina (LOPES et al., 1996). A ureia, uma substância nitrogenada não proteica, é metabolizada pelo fígado e levada pela corrente sanguínea aos rins, onde é filtrada e tem sua concentração plasmática reduzida (TYMOCSKO et al., 2011). A Figura 13 ilustra os níveis séricos de ureia nos diferentes grupos experimentais, obtido através do exame sorológico realizado 6 dias após a inoculação das doses vacinais.

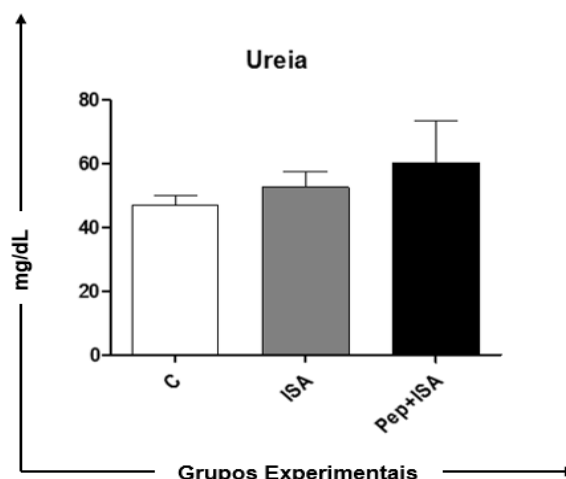


Figura 13 - Dosagens dos níveis de ureia em mg/dL efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61-VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de *L.major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61-VG (Pep+ISA).

Nos grupos de hamsters estudados, a dosagem de ureia encontrada foi de  $46,99 \pm 4,70$  mg/dL para o grupo controle enquanto os grupos inoculados com ISA e com Pep+ISA apresentaram respectivamente concentrações de  $52,54 \pm 8,40$  mg/dL e  $60,00 \pm 12,10$  mg/dL, mostrando-se todos acima do valor de referência citado por outros autores (Tabela 2).

Embora o nível elevado de ureia no plasma possa servir como indicador para prever a insuficiência renal, devido a diferentes tipos de lesões (glomerular, tubular, intersticial ou vascular) (STOCKHAM e SCOTT, 2002), os altos resultados encontrados nos grupos ISA e Pep+ISA não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle e também foram semelhantes aos observados nos animais do grupo controle do estudo realizado por MOREIRA e colaboradores (2016) (variação de 35-55mg/dL). Desta forma, os resultados obtidos não devem sugerir a toxicidade dos seus inóculos, ainda mais se considerando que a concentração de ureia no plasma de hamsters e de outros animais sofre influência de fatores extra-renais como: alimentação, hidratação, tempo de jejum, temperatura, entre outros (STOCKHAM e SCOTT 2002; TOMPSON e WARDROP, 1987). Por isso há necessidade de avaliação de outras substâncias, como a creatinina, para melhor interpretação do funcionamento renal.



Tabela 2 - Valores bioquímicos séricos em hamster para ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), aspatato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Teste bioquímico	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.

A creatinina excretada diariamente pelos rins, por sua vez, não sofre influência de outros fatores como a dieta alimentar, idade e sexo e é proporcional a massa corporal do animal (LOPES et al., 1996). Por ser totalmente excretada pelos glomérulos sem que haja reabsorção tubular, seu aumento na circulação sanguínea é utilizado como indicativo de deficiência da filtração glomerular renal (EMANUELLI et al., 2008).

Como mostra a Figura 14, as concentrações de creatinina nos hamsters do experimento foram de  $0.45 \pm 0.09$  mg/dL para o grupo controle,  $0.52 \pm 0.04$  mg/dL para o grupo ISA e de  $0.33 \pm 0.24$  mg/dL para o grupo Pep+ISA.

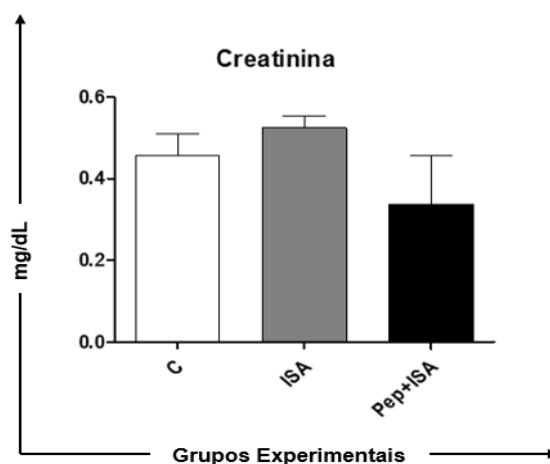


Figura 14 - Dosagens dos níveis de creatinina em mg/dL efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanide ISA-61-VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de *L.major* associado ao adjuvante Montanide ISA-61-VG (Pep+ISA).

Os resultados obtidos nos grupos do experimento não tiveram variações significativas entre eles e seus valores correspondem a faixa sérica de referência citada por CARPENTER (2005) e SUCKOW et al. (2012) (Tabela 2). As baixas concentrações se justificam, pois este metabólito é removido quase inteiramente do plasma durante a filtração glomerular normal (TOMPSON e WARDROP, 1987; EMANUELLI et al., 2008).

### **5.1.2 Função hepática**

Os testes bioquímicos para avaliar a integridade hepática podem ser classificados em dois grupos (LOPES et al., 1996), ambos relacionados com os níveis séricos das enzimas hepatocelulares. No primeiro grupo incluem os testes indicativos de extravasamento hepatocelular – caracterizados pela dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e a asparato aminotransferase (AST) e no segundo grupo, os testes indicativos da integridade do sistema biliar - caracterizados pela dosagem de fosfatase alcalina (FA) (THRALL et al., 2007).

Os resultados obtidos com as enzimas hepáticas AST e ALT, em todos os grupos de hamsters, não apresentaram valores que estivessem fora dos limites normais de referência apresentados na Tabela 2. Dados estes que corroboram com o estudo de MOREIRA et al., (2016), onde o grupo de hamsters não infectados apresentaram valores de AST e ALT numa variação de 60-120 UI/L e 70-120 UI/L respectivamente.

Neste trabalho, a concentração média de AST foi de  $108,00 \pm 28,22$  UI/L para o grupo controle,  $106,40 \pm 46,97$  UI/L para o grupo ISA e  $59,06 \pm 28,32$  UI/L para o grupo Pep+ISA, enquanto a concentração média de ALT foi de:  $68,63 \pm 27,82$  UI/L para o grupo controle,  $57,67 \pm 25,63$  UI/L para o grupo ISA e  $60,30 \pm 8,30$  UI/L para o grupo Pep+ISA (Figura 15).

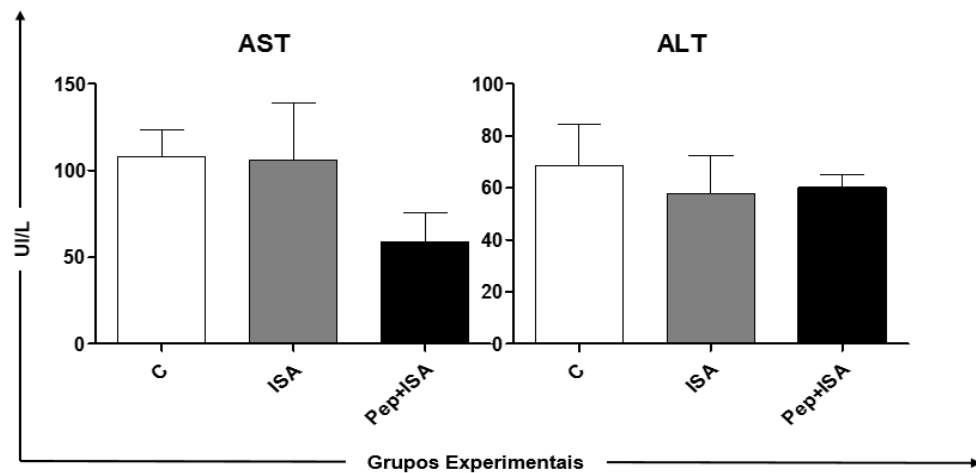


Figura 15 - As dosagens dos níveis de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) em UI/L efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanine ISA-61VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de L. major associados ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Pep+ISA).

Estes resultados, demonstraram que o adjuvante ou a associação do adjuvante com os peptídeos não lesaram as células hepáticas, uma vez que estas enzimas são consideradas de extravasamento, somente a lesão dos hepatócitos, local onde as enzimas ALT e AST se encontram (ALT - encontrada principalmente no citoplasma; AST - 80% está presente na membrana da mitocôndria) aumentaria consideravelmente os níveis séricos no plasma (TENNANT, 1997; THRALL et al, 2007).

Assim como as enzimas acima citadas, a FA, não apresentou diferença significativa nos três grupos experimentais, com uma concentração sérica média compatível como o descrito por CARPETER (2005) e SUCKOW et al. (2012) (Tabela 2). No grupo controle a concentração sanguínea da FA foi de  $81,55 \pm 18,78$  UI/L, no grupo ISA foi de  $63,43 \pm 12,30$  UI/L e no grupo Pep+ISA foi de  $57,49 \pm 11,71$  UI/L (Figura 16).

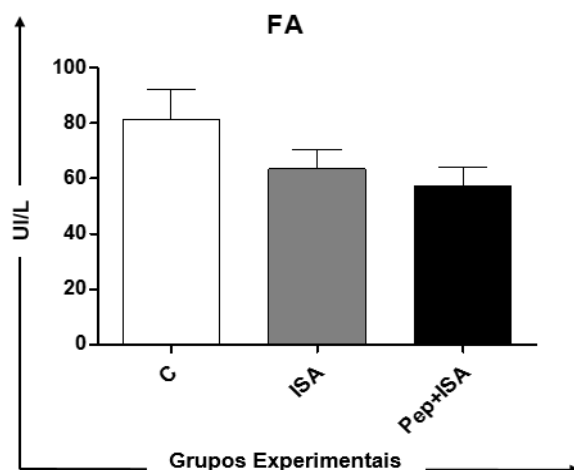


Figura 16 - As dosagens dos níveis de FA (Fosfatase Alcalina) efetuadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com: solução salina (C), peptídeo Montanine ISA-61VG (ISA) e imunizados com peptídeos vacinais de *L. major* associados ao adjuvante Montanide ISA-61VG (Pep+ISA).

Os resultados dentro do intervalo de normalidade demonstram que as formulações testadas não provocaram estímulo da atividade sérica, que aumentaria a produção dessa enzima pelos hepatócitos (KERR, 2003; THRALL et al., 2007), nem afecções hepáticas obstrutivas (colestase), que reduziria a excreção biliar da FA (TENNANT, 1997; KERR, 2003; MOTTA, 2003).

## 5.2 Avaliação hematológica

### 5.2.1 Leucograma

Os dados do leucograma (Tabela 3) apresentou a média do número absoluto dos Leucócitos, constituído do somatório dos valores de Neutrófilos, Eosinófilos, Monócitos e Linfócitos para os grupos de hamsters do experimento (grupo Controle, grupo ISA e grupo Pep+ISA).

Tabela 3 - Leucograma dos três grupos experimentais (controle, adjuvante e peptídeos + adjuvantes) obtido da coleta sanguínea após seis dias da última dose vacinal.

<b>Leucócitos</b>	<b>Controle</b>	<b>ISA</b>	<b>Pep + ISA</b>
Global de Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	5131±1701	5289±2547	5593 ±1184
Neutrófilos	1175 ± 181 22,90% ± 3,53%	1117 ± 129 21,12% ± 2,44%	969 ± 62 17,32% ± 1,11%
Eosinófilos	7 ± 6 0,13% ± 0,12%	33 ± 22 0,62% ± 0,41%	44 ± 17 <sup>a</sup> 0,79% ± 0,30%
Monócitos	301 ± 67 5,87% ± 1,30%	321 ± 61 6,07% ± 1,15%	133 ± 25 <sup>a,b</sup> 2,38% ± 0,45%
Linfócitos	3648 ± 162 71,10% ± 3,12%	3818 ± 169 72,19% ± 3,20%	4447 ± 58 <sup>a,b</sup> 79,51% ± 1,04%

Nota: <sup>a</sup>a = estatístico em relação ao grupo controle

<sup>b</sup>b = estatístico em relação ao grupo ISA

A variação estatística existente entre o grupo Pep+ISA e o grupo Controle, com relação aos eosinófilos – população responsável pela regulação alérgica e infecções helmínticas, porém, somente, quando associado com a elevação dos monócitos - não foram comentadas devido a não ter significância clínica nem influência com o presente trabalho. Todos os resultados encontrados nos três grupos estavam dentro dos limites de normalidade (em porcentagem), quando comparados com a Tabela 4. Na comparação entre grupos, houve variação estatística nos valores dos monócitos e linfócitos do grupo Pep+ISA em relação aos outros dois grupos (Controle e ISA). Os monócitos apresentaram uma redução (monocitopenia) e os linfócitos um acréscimo dos seus valores (linfocitose).

Tabela 4 - Valores de referência de análises hematológicas em hamsters.

<b>Parâmetro Hematológico</b>	<b>Valor (%)</b>
Neutrófilos	17-35
Eosinófilos	0-5
Monócitos	0-5
Linfócitos	50-96

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

De maneira geral, esperava-se encontrar uma quantidade de monócitos semelhante em todos os grupos, devido ao tempo decorrido para a coleta de sangue (6 dias) e a presença da população na infecção (primeiras 72 horas), isto é, já havia passado tempo suficiente para a reposição dessa população de células no plasma sanguíneo, cujo o recrutamento para a área de infecção ocorre, em maior escala, nos 3 primeiros dias. Diante disso, de acordo com o resultado do leucograma, sugere-se que no grupo vacinal tenha ocorrido uma modulação da resposta imune, havendo um maior recrutamento celular dos monócitos, com conseqüente degradação do antígeno e seguida da migração desta população (já como macrófagos) para os linfonodos (GUIMARAES e GAMA FILHO, 2009). Quanto ao aumento da população de linfócitos, as variações encontradas no leucograma indicam, de maneira preliminar, a existência de memória imunológica, estimulada pela consecutiva exposição dos hamsters imunizados com a formulação vacinal em questão.

### **5.3 Detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em soros de hamsters pelo método de ELISA**

As respostas do sistema imune, tanto celular quanto humoral, possuem especificidades e as suas ações podem ser coordenadas ou antagônicas. A modulação da resposta vai depender das citocinas envolvidas na defesa do hospedeiro, dessa forma, a presença de células ou fatores específicos que elevem uma determinada citocina podem intensificar ou debelar uma certa infecção. (MILLS e McGUIRK, 2004).

Títulos de anticorpos podem ter ação de aglutinação do parasito, além de sinalizar a entrada deste na célula, estimulando a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) e a fagocitose deste pelos macrófagos para elimina-lo (DWYER, 1976). Contudo, na leishmaniose, a imunidade celular - vital para o desenvolvimento de resistência e cura da doença – deve ser mais abrangente que a produção de anticorpos pelos linfócitos B, determinando assim, uma fraca resposta humoral e baixos níveis de anticorpos séricos (LARANGEIRA, 2008).

Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade do peptídeo sintético da gp63, os animais de todos os grupos experimentais tiveram o sangue coletado 6 dias após a terceira dose vacinal. A Figura 17 ilustra a média da densidade óptica (D.O) obtida para cada grupo experimental.

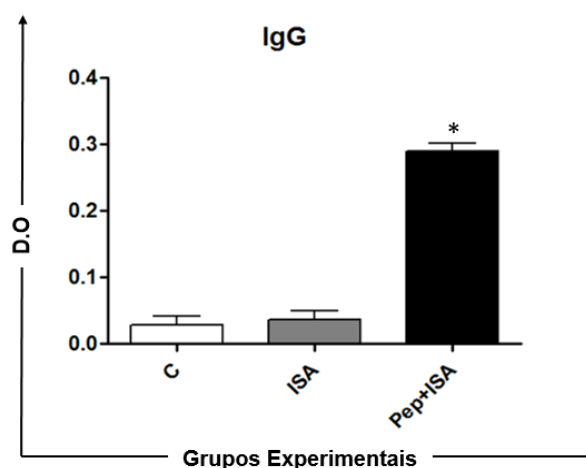


Figura 17 - Nível de anticorpo igG anti-Leishmania, nos diferentes grupos experimentais: controle (C), adjuvante (ISA) e vacina (Pep+ISA). Os resultados estão sendo expressos como densidade óptica (D.O). Cada barra representa dados agrupados (média  $\pm$  desvio padrão) de três hamsters (*Mesocricetus auratus*).

Foi observada similaridade entre as médias dos títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no grupo controle (C) e no grupo apenas com o adjuvante (ISA), com valores de 0,028 e 0,035 respectivamente (Figura 17). Dados semelhantes ao observado neste estudo, têm sido também demonstrando por MOREIRA, (2012), utilizando hamsters não infectados (0,04-0,07). Os baixos níveis de anticorpos podem ser justificados pela falta de estímulo nos grupos de ambos experimentos.

Muito embora o grupo imunizado com o peptídeo + adjuvante (Pep+ISA) tenha mostrado uma absorvância significativamente maior de anticorpos IgG anti-*Leishmania* (0,289) quando comparado aos demais grupos, que receberam apenas a solução salina e a solução salina com adjuvante, ainda assim, esse resultado pode ser classificado como uma titulação baixa de IgG total. Em concordância, valores de D.O inferiores a 0,4 também foram considerados baixos por TEIXEIRA et al. (2011), após avaliar o estímulo da produção igG total em grupo de cães imunizados com duas injeções de lisado de promastigotas de *L. infantum*. Formulação vacinal, que teve característica de resposta humoral fraca, e à qual, segundo o autor, se poderia atribuir o porquê da manutenção da saúde prolongada dos cães estudados, após

terem sido contaminados com leishmania por via subcutânea. CAMPOS et al., (2011) utilizando uma diluição de 1:40, para avaliar a técnica de ELISA na detecção de cães contaminados e assintomáticos, considerou positivo, apenas os cães que apresentaram D.O elevada para IgG total, isto é, maior que o ponto de corte estabelecido (0,571). Da mesma forma, COSTA et al. (2010) ao conduzirem seus estudos com felinos, utilizando uma diluição do soro de 1:400, consideraram titulações de anticorpos elevadas as que apresentavam resultados de D.O maior que 0,365, ficando estes classificados com animais infectados, fossem eles sintomáticos ou assintomáticos.

PEREIRA (2015), avaliou a capacidade protetora de histonas nucleossômicas de *L. infantum* (HIS) e a proteína ácida ribossômica P0 (LIP0) contra infecção por *L. infantum*, utilizando duas formas de imunização: homóloga e heteróloga no modelo hamster. Corroborando com o presente estudo, ao comparar os valores de IgG dos grupos vacinais com o grupo controle, os resultados da titulação foram considerados significativamente altos nos grupos imunizados com estratégia heterogênea. No entanto foi verificado que apenas a vacina homóloga baseada em Lip0, cujos níveis de IgG foram baixos, seria capaz de induzir uma resposta leishmanicida.

De forma semelhante, estudos conduzidos por KUSHAWAHA et al, (2012) e BAHARIA et al., (2015) ao utilizarem antígeno diferentes também exibiram baixa titulação de IgG total, e concluíram no final de seus estudos, conduzidos de forma mais aprofundada, que suas formulações apresentaram potencial como candidata vacinal contra LV. O mesmo resultado foi observado também em cães nos estudos conduzidos por AGUIAR-SOARES et al., (2014) utilizando uma vacina composta de antígenos brutos de *L. braziliensis*, saponina e extrato de glândula salivar de mosca da areia (LBSapSal). Interessantemente, em todos os trabalhos citados, onde se testaram vacinas contra *Leishmania*, as formulações que apresentavam estímulos de anticorpos, porém, em concentrações baixas, demonstraram uma tendência de resposta do sistema imune com perfil de citocinas Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ ). Resposta que desempenha um importante papel na cura e prevenção da LV e que foi verificada por meio de análises mais específicas e detalhadas nestes trabalhos.



#### 5.4 Avaliação da resposta linfoproliferativa

A capacidade linfoproliferativa é uma característica desejada da vacina, refletindo a estimulação das respostas das células T (DAS e ALI, 2014). A fim de analisar a resposta linfoproliferativa de memória ao antígeno presente na composição vacinal foram utilizados dois estímulos antigênicos: ASLi (antígeno solúvel de *Leishmania infantum*) e peptídeo sintético de *Leishmania major*. De acordo com LARANGEIRA (2008), a prática de ensaios de linfoproliferação pode ajudar na avaliação da resposta imunológica celular, tanto na leishmaniose humana quanto canina, frente a diferentes antígenos apresentados. A Figura 18 mostra o resultado da atividade linfoproliferativa nos diferentes grupos experimentais (controle, ISA e pep+ISA).

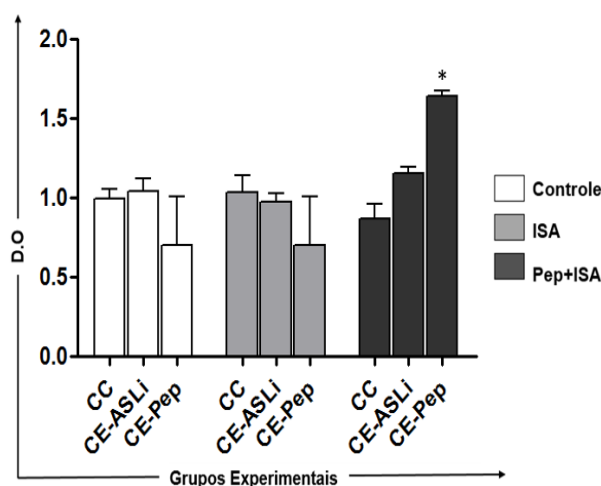


Figura 18 - Resposta linfoproliferativa de células do baço de hamsters nos diferentes grupos experimentais (controle, ISA e Pep+ISA) obtido através do ensaio ELISA após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (CE-ASLi) e peptídeo sintético de *Leishmania major* (CE-Pep). A proliferação é representada como a densidade óptica (D.O). Cada barra representa dados agrupados (média  $\pm$  desvio padrão) de três hamsters (*Mesocricetus auratus*).

Conforme nossos dados demonstram, os animais do grupo controle, apresentaram uma D.O de 0,989 na cultura controle (CC), 1,04 na cultura estimulada com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (CE-ASLi) e 0,699 na

cultura estimulada com o peptídeo (CE-Pep). Quanto ao grupo ISA, os animais apresentaram uma resposta proliferativa de 1,033, 0,972 e 0,701 para CC, CE-ASLi e CE-Pep respectivamente.

De acordo com os resultados, todos os animais apresentaram uma pequena proliferação celular, contudo não foi observada diferença significativa entre as culturas estimuladas com AsLi e Pep nos grupos controle e ISA, quando comparado com o controle positivo (CC). De forma geral, esperava-se que em ambos os grupos a resposta proliferativa realmente não fosse elevada, uma vez que durante todo o protocolo vacinal, estes grupos não foram sujeitos a nenhum tipo de estímulo antigênico.

Por outro lado, os grupos vacinados com o peptídeo associado ao adjuvante ISA apresentaram um perfil diferente quanto aos níveis de resposta proliferativa, que revelou um aumento significativo na cultura estimulada com o peptídeo (Figura 18), corroborando com os estudos de LAKSHMI et al., 2014 que também observaram aumento da atividade linfoproliferativa nas culturas estimuladas com o antígeno solúvel em animais previamente imunizados e desafiados. Fato que demonstra a existência de memória imunológica.

De forma similar DAS e ALI, (2014), ao conduzirem seus estudos com proteínas recombinantes CPs (rCPA, rCPB e rCPC) de *L. donovani*, observaram proliferação em todos os grupos vacinados, exibindo níveis significativamente maiores na cultura estimulada com coquetel lisossômico (rCPA+rCPB+rCPC). Resultados semelhantes foram obtidos por GUPTA et al., (2012) e KUMARI et al., (2012).

AGUIAR-SOARES et al., (2014) ao utilizarem antígeno solúvel da vacina (VSA) e antígeno solúvel de *L. infantum* (SLiA) exibiram um índice proliferativo significativamente mais alto nos cães imunizados com a vacina LBSapSal e infectados com *L. infantum* em comparação aos demais grupos. Maiores valores de D.O foram observados nas culturas dos cães após estímulos com SLiA, contudo uma resposta significativa também foi observada no grupo estimulado com VSA. Tais resultados dão suporte à metodologia adotada no nosso estudo, onde se utilizou o antígeno de uma espécie causadora da LT para conseguir resposta imunológica contra LV.

Segundo RUITENBERG e colaboradores (2001), a linfoproliferação obtida após o estímulo com antígeno de *L. infantum*, *in vitro*, representa uma ativação

antígeno-específica de linfócitos T que levam à produção de IFN- $\gamma$  com consequente atividade citotóxica dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> e a lise dos macrófagos infectados, enquanto que a redução da resposta linfoproliferativa, *in vitro*, frente a um antígeno-específico caracteriza uma resposta imune com maior susceptibilidade da doença, sem produção significativa de IFN- $\gamma$ , uma das citocinas chaves para a proteção frente à infecção pelo parasito.

## 6 CONCLUSÃO

Embora este estudo não tenha avaliado de forma aprofundada as imunoglobulinas e citocinas específicas envolvidas na resposta estimulada pela formulação vacinal, por se tratar de uma avaliação preliminar. Foi possível concluir com os resultados obtidos, que:

- A formulação testada se mostrou inócua e não tóxica, uma vez que não foi observado alterações clínicas (febre), comportamentais (neurológicas), gastrointestinais (vômito/diaréia), no local do inóculo (nodular/ulcerativa) e sistêmicas (alteração nos níveis séricos dos resultados bioquímicos), dando suporte para a segurança vacinal;
- A formulação proposta foi capaz de promover níveis significativos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no grupo vacinado em relação aos demais grupos, mantendo a titulação destes em concentrações desejáveis;
- A vacina foi capaz de gerar memória imunológica, evidenciada pelo aumento da atividade linfoproliferativa no grupo vacinado;

Os resultados obtidos, usando o modelo hamster, demonstraram que a formulação vacinal proposta apresentou características que tendem à desencadear a resposta imunológico desejada para uma vacina contra a leishmaniose visceral, baixa resposta humoral e possivelmente alta resposta celular. Desta forma, se eleva a expectativa de bons resultados na utilização da associação desses peptídeos e o adjuvante Montanide ISA-61VG em um estudo mais dispendioso, utilizando cães como modelo experimental e com análises mais complexas e específicas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ABBAS, A.K. LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 592p.

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, p.61, 2014.

ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; LARRAGA, V. Rationale for selection of developmentally regulated genes as vaccine candidates against *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, v.34, n.46, p.5474-5478, 2016.

ANDRADE, B.B.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Role of Sand fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.66, n.2-3, p.122-127, 2007.

BAILEY, M. S. & LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v.25, n.2, p.203-211, 2007.

BAHARIA, R. K.; TANDON, R.; SHARMA, T.; SUTHAR, M. K.; DAS, S.; SIDDIQI, M. I.; SAXENA, J. K.; SUNDAR, S.; DUBE, A. Recombinant NAD-dependent SIR-2 Protein of *Leishmania donovani*: Immunobiochemical Characterization as a Potential Vaccine against Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.3, 2015.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J. M.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7160-7171. 2005.

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. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2014, p.9-18.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan**. 2012. Disponível em:

<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2012/d0205.def>> Acesso em 17 de Fevereiro de 2016.

BRASIL. Leishmaniose Visceral (LV): Situação Epidemiológica – Dados. **Portal da Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em 14 de Novembro de 2016.

BRITTINGHAM, A; MORRISON, C.J.; McMASTER, W.R.; McGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v.155, n.6, p.3102-3111, 1995.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n.71, p.86-92, 2007.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CAMARGO, L.B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, p.527-548, 2006.

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 27 de março de 2017.

CANAL, C.W.; VAZ, C.S.L. Vacinas víricas. In: FLORES, E.F. **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2 ed. Santa Maria: UFSM, 2012. p.369-398.

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

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

CFSPH. Center for Food Security & Public Health: **Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral)**. 2009. Disponível em: < <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>>. Acesso em 14 de Novembro de 2016.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v.141, n.21, p.539-43, 1997.

CUERVO, P.; SANTOS, A.L.S.; ALVES, C.R.; MENEZES, G.C.; SILVA, B.A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O.; CUPOLILLO, E.; JESUS, J.B. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) brazillensis* strains. **Acta Tropica**, v.106, n. 3, p.143-148, 2008.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, n.2, p.132-141, 2002.

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; GOMES, A.A.D.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.3, p.212-217, 2010.

DA SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n.1-2, p.150-154, 2010.

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, 2014.

DWYER, D.M. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. **Journal of Immunology**, v.117, n.6, p.2081-2091, 1976.

DE ANDRADE, H. M.; REIS A. B.; DOS SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.3-4, p.231-238, 2006.

DE MORAIS, G. C. V.; LIMA, A. K. C.; TERRA, R.; SANTOS, R. F.; SILVA, S. A. G.; DUTRA, P. M. L. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, 2015.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1455, n. 2-3, p.341-342, 1999.

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

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.53, n.1, p.3-11, 2011.

EMANUELLI, M.P.; LOPES, S.T.A.; MACIEL, R.M.; GARMATZ, B.C.; TAVARES, M.O. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n. 1, p. 251-255. 2008.

ENGWERDA, C. R., ATO, M.; COTTEREL, S.E.; MYNOTT, T.L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P.M.; KAYE, P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **The American Journal of Pathology**, v.161, n.2, p.429-437, 2002.

FERREIRA, J.; PORCO, A. Vacunas derivadas del análisis de los genomas vacunologia inversa. **Interciencia**. v. 33, n. 5, p.353-358, 2008.

FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**. v. 105, n.573-576, p.11-20, 2010.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, p.439-454, 2006.

GENARO, O. REIS, A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1, cap. 8, p. 47-64.

GHOSH, M.; MANDAL, L.; MAITRA, S.; RAKSHIT, S.; PAUL, K.; BAGCHI, J.; GANGULY, D.; PAL, C.; BANDYOPADHYAY, S. *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. **The Journal of Infectious Diseases**. v.194, n.3, p.294-301, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **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, desafio e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia**. v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v.100, n.1-2, p.87-103, 2001.

GRIESVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, n.2, p.309-322, 2012.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. **The Lancet. Infectious Diseases**. v.2, n.8, p.494-501, 2002.

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.

HAGIWARA, M. K.; LUSTOSA, M.; KOGIKA, M. M. Leptospirose canina. **Veterinary News**, v. 11, n. 67, p. 7-8, 2004.



HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.229-243, 2001.

HEINSON, A.I.; WOELK, C.H.; NEWELL, M.L. The promise of reverse vaccinology. **International Health**, v.7, n.2, p-85-89, 2015.

HERWALDT, B.L. *Leishmaniasis*. **The Lancet**. v.354, n.9185, p.1191-1199, 1999.

JACKSON, D.; CHUA, B.Y.; ZENG, W. Totally synthetic peptide-based vaccines that target dendritic cells and induce potent antibody or CTL response. **International Congress Series**, v.4, n.4, p.311-332, 2006.

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.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v.201, p.239-53, 2004.

KENNETH, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2014, 869p.

KERR, M.G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2.ed., São Paulo: Roca, 2003. 465p.

KHORASANI, A.; MADADGAR, O.; SOLEIMANJAH, H.; KEYVANFAR, H.; MAHRAVANI, H. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvante ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.17, n.1, p.8-12, 2016.

KUHLS, K.; MAURICIO, I.L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v.7, n.11-12, p. 1224–1234, 2005.

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, 2012.

LAINSON R.; SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press; p. 12-120. 1987.

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

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.

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.

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.

MACHADO, P.R.L.; CARVALHO, L. ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, E.M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros Dermatologia.** Rio de Janeiro. v.79, n.6, p. 647-664, 2004a.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Sínteses químicas e enzimáticas de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v.27, n.5, p.781-789, 2004b.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A, MARZOCHI, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.6, p.440-444, 2004.

MANGOUD, A. M.; RAMADAN, M. E.; MORSY, T.T.; AMIN, T.A.; MOSTAFA, S.N. Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.27, n.3, p.689-702, 1997.

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.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R., Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.41, n.5, p.61-84, 1981.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD J. R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p.188-9, 2000.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R.E.; RUSSELL, D.G. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.57, n.1, p-31-45, 1993.

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.; YANG, J.; Zhao, W.; PEREZ, I. E.; CHEING, J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 69, n.8, p.4719-4725, 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**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1, cap. 7, p. 41-46.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1, cap.10, p.67-83.

MILLS, K.H.; McGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v.16, n.2, p.107-117, 2004.

Ministério da Saúde (BR). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2014, p.9-18.

MOHAN, T.; VERMA, P.; RAO, D.N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. **Indian Journal of Medical Research**, v.130, n.5, p.779-795, 2013.

MOISA, A.A.; KOLESANOVA, E.E. Synthetic Peptide Vaccine. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**. v.4, n.4, p.321-332, 2010.

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.

MORA, M.; VEGGI, D.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Drug Discovery Today**, v.8, n.10, p.459-64, 2003.

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 diferente routes of inoculation. **Parasites & Vectors**, v.9, p.1-13, 2016.  
Disponível em:

<<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1464-y>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.

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** (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

MOTA, E.F.; LIMA, M.G.S.; MELO, D.F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v.16, n.2, p.79-88, 2006.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4 ed. São Paulo: EDUCS, 2003.

MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v.366, n. 9496, p.1561–1577, 2005.

NIETO, A., G.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Veterinary Research**, v.42, n.1, p.39, 2011.

NILSSON, B.L.; SOELLNER, M.B.; RAINES, R.T. Chemical synthesis of proteins. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.34, p.81-118, 2005.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M.; PAULA, H. N.; PERRI, S. H.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.153, n.19-23, 2008.

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.5, p.1377-1389, 2012.

PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; PIMENTEL, J.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; MENDES, M.A.D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary immunology and immunopathology**, v.88, n. 3-4, p.163-172, 2002.

PEARSON, R.D.; ROBERTS, D. Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.3, p.263-5, 1990.

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.; BRODSKY, 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, 2015.

PEREZ, L. E.; CHANDRASEKAR, B.; SALDARRIAGA, O. A.; ZHAO, W.; ARTEAGA, L. T.; TRAVI, B. T.; MELBY, P.C. Reduced Nitric Oxide Synthase 2(NOS2) Promoter Activity in the Syrian Hamster Renders the Animal Functionally Deficient in NOS2 Activity and Unable to Control an Intracellular Pathogen. **The Journal of immunology**, v.176, n.9, p.5519-5528, 2006.

PIMENTA, P.F.P.; FREITAS, V.C.; SECUNDINO, N.F.C.A. Interação do protozoário *Leishmanis* com seus insetos vetores. In:\_\_\_\_\_. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Cap.12, p.1-45, 2012.

PISCOPO, T.V.; MALLIA A.C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v.83, n.976, p.649-57, 2007.

PRAJEETH, C.K.; HAEBERLEIN, S.; SEBALD, H.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. **Infection and Immunity**. v.79, n.7, p.2699-708, 2011.

**PROTEIN DATA BANK.** Disponível em: <  
<http://www.genome.jp/Fig/pdb/pdb1lml.png>>. Acesso em: 15 de março de 2016.

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.

REIS, L. C.; BRITO, M.E.F.; S.M.A.; PEREIRA, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006. REY, L. O complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral. In.: Parasitologia. **Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3 ed., Guanabara Koogan, c. 19, 2001.

RIÇA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, v.89, n.3, p.163-9, 2003.

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 KMP2, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v.25, n.46, p.7962-7971, 2007.

ROSYPAL, A.C., ZAJAC, A.M, LINDSAY, D.S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, n.4, p.921-937, 2003.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; ANJUÈRE, F.; FERRUA, B.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **European Cytokine Network**, v.12, n.2, p.340-7, 2001.

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

SÁNCHEZ-SALDAÑA, L.; SÁENZ-ANDUGA, E.; PANCOBRO-MENZONA, J.; ZEGARRA-DEL-CARPIO, R.; GAROÉS-VELASCO, N.; REGIS-ROGGERO, A. Leishmaniasis. **Dermatologia Peruana**, v.,14, n.2, p.82-98, 2004.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L.A.; OLIVEIRA, G.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DOS-SANTOS, W.L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, n.10, p.515-24, 2008.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Leishmania**. Disponível em: <<https://www.sciencephoto.com/>>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2017.

SEPPIC. **Montanide™ Adjuvant ranges**. Disponível em: <<https://www.seppic.com/sites/seppic/files/2017/02/28/seppic-montanide.pdf>>. Acesso em: 23 de março de 2017.

SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology Internacional**. v. 56, n.1, p.3-7, 2007.

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, D.G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina, 2008.

SILVEIRA, F.T.; LIMA, L.V.R.; SANTOS, T.V.; RAMOS, P.K.S.; CAMPOS, M.B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v.7, p.15-22, 2016.

SINGH, S.P.; ROOPENDRA, K.; MISHRA, B.N. Genome-Wide Prediction of Vaccine Candidates for *Leishmania major*: An Integrated Approach. **Journal of Tropical Medicine**. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/709216>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2017.

STOCKHAM, L. S.; SCOTT, M. S. Urinary sistem. 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 Rodentes**. San Diego: Academic Press, 2012. p.57-116.

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. **Memórias 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, 1997. 932p.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

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.

TYMOCSKO, J. L.; BERG, J. M.; STRYER, L. **Bioquímica fundamental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 784p.

VAN DER BURG, S. H.; BJIKER, M. S.; WELTERS, M. J. P.; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. M. Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.8, p.016-930, 2006.

VIANNA, V. L.; TAKIYA, C. M.; DE BRITO-GITIRANA, L. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v.88, n.9, p.829-36, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n.949, p.1–186, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em: 10 de Novembro de 2016.

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 Biomechanical 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 espira-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/>