

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Marco Antonio Cabrera González

**ENSAIO PRÉ-CLÍNICO VACINAL EM HAMSTERS PARA ANÁLISE DA
IMUNOGENICIDADE DE UMA NANOFORMULAÇÃO CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Ouro Preto, MG
2016

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Marco Antonio Cabrera González

**ENSAIO PRÉ-CLÍNICO VACINAL EM HAMSTERS PARA ANÁLISE DA
IMUNOGENICIDADE DE UMA NANOFORMULAÇÃO CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti – Laboratório de Biologia das Interações Celulares (ICB/UFMG) e Núclei de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB)/UFOP).

Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira – Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia (CIPHARMA/UFOP).

Ouro Preto, MG

2016

C117e Cabrera González, Marco Antonio.

Ensaio pré-clínico vacinal em hamsters para análise da imunogenicidade de uma nanoformulação contra a leishmaniose visceral [manuscrito] / Marco Antonio Cabrera González. - 2016.

vx, 79f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti.
Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde Humana e Animal.

1. Vacinas. 2. Leishmaniose visceral. 3. Nanotecnologia. 4. Hamster como animal de laboratório. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

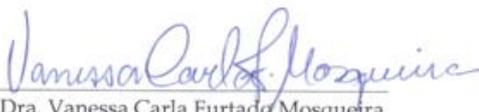


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

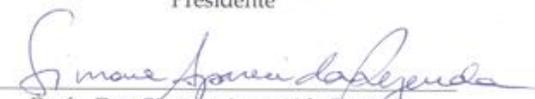
“Ensaio pré-clínico vacinal em hamsters para análise da imunogenicidade de uma nanoformulação contra a leishmaniose visceral”

Ao primeiro dia do mês de março de 2016, às 14h00min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Marco Antonio Cabrera González**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
Presidente



Profa. Dra. Simone Aparecida Rezende
Examinadora (UFOP)



Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 01/03/2016



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Universitário

Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559 1680

E-mail: biotec@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/biotec

Dra. Rita de Cássia Oliveira Sant'Ana¹

Dra. Giani Martins Garcia²

Dra. Patricia Silveira¹

Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes³

Ms. Mauricio Acevedo¹

Ms. Otoni Melo¹

Jaqueline Costa Leite¹

Jennifer Ottino¹

Leonardo Augusto de Melo¹

Dra. Walderez Ornelas Dutra¹

1 – Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

2 – Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (EFAR-UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais.

3 - Laboratório de Patologia Clínica e Anexo, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Edital 02/2015 - Programa Pesquisador Mineiro - PPM IX - Processo CBB - PPM-00609-15. Projeto: *“Estabelecimento de um modelo de testes in vivo para avaliação da imunogenicidade vacinal com implantes de esponjas em camundongos BALB/C e C57BL/6.*

Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados da UFMG. EDITAL PRPq - 01/2013 e 14/2013 - Projeto: *“Análise da imunogenicidade e eficácia de diferentes candidatos vacinais contra leishmaniose visceral em uma plataforma de testes in vivo”.*

Edital Universal FAPEMIG 01/2013 – processo APQ-02372-13. Projeto: *“Estabelecimento de um Modelo de Testes in vivo para Avaliação da Imunogenicidade Vacinal com Implantes de Esponjas em Camundongos BALB/c e C57BL/6”.*

Programa de Pesquisa para o SUS – PPSUS - processo CDS - APQ-03576-13. Projeto: *“Desenvolvimento tecnológico para o controle da leishmaniose visceral: uma nova estratégia empregando-se seleção e teste de alvos vacinais com antígenos do hospedeiro invertebrado e do parasito em uma plataforma de ensaios pré-clínicos e clínicos vacinais”.*

Edital Universal 14/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – Processo APQ–01698-12. Projeto: *“Estabelecimento da plataforma de testes destinada aos ensaios pré-clínicos vacinais contra leishmanioses”;*

Edital/Chamada: Produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora - DT 2011 – processo 310129/2011-7. Projeto: *“Desenvolvimento de Protótipo para Predição de Imunogenicidade e Eficácia em Candidatos a Vacinais contra Leishmaniose Visceral Canina”.*

Organização dos Estados Americanos (OEA) e Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), com o apoio da Divisão de Temas Educacionais do Ministério das Relações Exteriores do Brasil. Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC) PAEC OEA/GCUB 2013.

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte, Minas Gerais;

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) – Ouro Preto, Minas Gerais.

Instituto Nacional de Innovación Agraria del Perú – INIA.

*A dedico, Josefina, Melanie, Marco, Maria,
Alejandro e Doraliza.*

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar diariamente, me dar saúde e permitir que eu encontrasse forças nos momentos difíceis que fizeram-me lembrar de minha família no Perú, mostrando-me que os esforços são importantes e que sempre vale a pena seguir em frente.

Agradeço ao Professor Rodolfo, meu orientador, minha gratidão pelo grande ensinamento, pelo amadurecimento, pela confiança e pela paciência.

A Professora Vanessa Mosqueira, minha gratidão por ter proporcionado a produção das nanopartículas e a co-orientação deste estudo.

À Giani, agradeço pela ajuda no desenvolvimento e caracterização das partículas no LDG Nano.

À Rita, Patricia, Jaqueline, o meu apreço pelo apoio na tradução do espanhol para o português, o mais profundo agradecimento.

A Maurício, Otoni, agradeço pela ajuda na realização de meu trabalho.

Aos professores do LABIC, Walderez, Micena, Paula, Juliana e Ken, agradeço pelos momentos compartilhados no laboratório.

Agradeço ao Professor Nelder e ao César pela confiança e ajuda no isolamento de intestino de flebotomíneo.

Índice

Lista de Figuras	X
Lista de Tabela	XI
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	XII
Resumo	XIV
Abstract	XV
1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais associados a infecção pelo gênero <i>Leishmania</i> e leishmanioses.....	2
2. Revisão de Literatura	5
2.1 A resposta imune anti- <i>Leishmania</i>	6
2.2 O modelo hamster utilizado em vacinas anti-Leishmaniose	9
2.3 Adjuvantes em vacinas contra as leishmanioses e nanoformulações.....	13
2.4 Candidatos vacinais contra a leishmaniose visceral.....	15
3. Justificativa.....	20
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo Geral.....	23
4.2 Objetivos Específicos.....	23
5. Animais, Materiais e Métodos	25
5.1 Animais	25
5.2 Obtenção e produção dos candidatos vacinais	25
5.2.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante	25
5.2.2 Obtenção da nanoformulação vacinal	26
5.3 Delineamento e protocolo experimental	27
5.4 Desafio experimental	29
5.5 Avaliação dos aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade.....	30
5.5.1 Análise dos aspectos clínicos, da sobrevivência e da massa corporal.....	30
5.6. Análise da função hepática e renal.....	31
5.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	31
5.8 Avaliação do perfil humoral.....	33
5.8.1 Análise dos níveis de IgG total anti- <i>Leishmania</i>	33
5.9 Quantificação da carga parasitária no baço e no fígado.....	34
5.10 Análises estatísticas.....	35
6. Resultados	36
6.1 Avaliação de inocuidade e toxicidade vacinal	37
6.3 Avaliação da massa corporal.....	40
6.4. Análise bioquímica - função hepática	43
6.5. Análise bioquímica - função renal	44

6.6 Eritrograma	46
6.7 Leucograma.....	48
6.8 Avaliação da resposta imune humoral	50
6.9 Avaliação da carga parasitaria no baço e fígado	52
7. Discussão.....	54
8. Conclusões	61
9. Referências bibliográficas.....	63
10. Anexo	78

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema do desenho experimental para avaliação dos hamsters submetidos a diferentes protocolos vacinais.	29
Figura 2 - Alterações dermatológicas nos animais dos grupos experimentais	37
Figura 3 - Alterações macroscópicas observadas na região dorsal de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais.....	40
Figura 4 - Avaliação da massa corporal de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais	41
Figura 5 - Alterações macroscópicas no fígado e no baço de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais	42
Figura 6 - Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em hamsters dourados, após 30 dias da terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com <i>L. chagasi</i> (T180).....	44
Figura 7 - Níveis séricos de uréia e creatinina em hamsters dourados, após 30 dias da terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com <i>L. chagasi</i> (T180).	46
Figura 8 - Eritrograma de hamsters dourados, 30 após a terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com <i>L. chagasi</i> (T180).	47
Figura 9 - Leucograma de hamsters dourados, 30 após a terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com <i>L. chagasi</i> (T180)	49
Figura 10 - Reatividade de IgG total anti- <i>L. chagasi</i> obtida a partir de amostras de soros de hamster.....	51
Figura 11 - Carga parasitária obtida a partir do baço (A), fígado (B) e correlação entre os níveis de IgG total anti- <i>L. chagasi</i> e a carga parasitária esplênica (C), empregando-se o método de diluição limitante..	53

Lista de Tabela

Tabela 1 - Preparação das partículas submicrométricas (PSm) com as diferentes concentrações utilizadas. 27

Tabela 2 - Valores de referência de bioquímica sérica de hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), linhagem BIO15.16, idade entre 12 e 18 meses. Resultados expressos em (mg/dL) e (IU/L), para machos e fêmeas. 31

Tabela 3 - Valores de referência de hematologia do hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), linhagem BIO15.16, idade entre 12 e 18 meses. Resultados expressos em valores absolutos e percentuais, para machos e fêmeas. 32

Tabela 4 - Avaliação da frequência de alterações clínicas e da mortalidade, observadas em hamsters dourados, dos diferentes grupos experimentais, até a data da eutanásia. ... 39

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC – Células apresentadoras de antígenos	LA – Grupo Antígeno bruto <i>L. amazonensis</i>
BCG – <i>Bacillus</i> de Calmette e Guérin	LA-PSmG – Grupo Partícula submicrométrica Grande + <i>L. amazonensis</i>
CD4 – Marcador de superfície celular de linfócitos T auxiliares	LA-PSmP – Grupo Partícula submicrométrica Pequena + <i>L. amazonensis</i>
CD8 – Marcador de superfície celular de linfócitos T citotóxicos	LASAP – Grupo Antígeno bruto <i>L. amazonensis</i> associado a Saponina
Controle – Grupo controle infectado	LC – Leishmaniose cutânea
CpG – Oligonucleotídeos	LCD - Leishmaniose cutânea difusa
CR1 – <i>Complement receptor 1</i>	LJM19 – Proteína Salivar de <i>L. longipalpis</i>
DNA – <i>Deoxyribonucleic acid</i>	LTA - Leishmaniose tegumentar americana
ELISA – <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	LVC – Leishmaniose visceral canina
FML – <i>Fucose manose ligant</i>	MPL – Monofosforil lipídio
gp63 – glicoproteína protease de superfície	MR – Receptor fucose manose
i.p. – via intraperitoneal	NO – Oxido Nítrico
IFN- γ – Interferon- γ	NOS – Nitric Oxide Synthase
IgG - Imunoglobulina da classe G	NOS2 – Nitric Oxide Synthase 2
IgG1 - Imunoglobulina da classe G1	
IgG2 - Imunoglobulina da classe G2	
IL-2 – Interleucina 2	
IL-4 – Interleucina 4	
IL-5 – Interleucina 5	
IL-6 – Interleucina 6	
IL-10 – Interleucina 10	
IL-12 – Interleucina 12	
IL-13 – Interleucina 13	
iNOS - <i>Nitric Oxide Synthase inducible</i>	
KMP11 – <i>Kinetoplastid membrane protein -11</i>	
L (V) – <i>Leishmania (Viannia)</i>	

OMS – Organização Mundial da Saúde
Leishmaniose visceral canina
PAMPs – Padrões moleculares
associados a patógenos
PLA – Polímero ácido poli *D,L*-lático
PLGA – *Poly-lactic-co.glycolic acid*
PSmG – Grupo Partícula submicrométrica Grande vazia
PSmP – Grupo Partícula submicrométrica Pequena vazia
RNAm – Acido ribonucleico mensageiro
Sap – Grupo Saponina
SFM – Sistema fagocítico mononuclear
T0 – Tempo Pré-Imune
T3 – Tempo 30 dias após a 3º dose de imunização
T180 – Tempo 180 dias após a desafio
TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral-beta
Th1 – *T helper 1*
Th2 – *T helper 2*
TLR4 – *Toll-like receptor 4*
TLR9 – *Toll-like receptor 9*
TLRs – *Toll-like recepto*

Resumo

A leishmaniose visceral é causada pelo parasito *Leishmania chagasi* (sinonímia *L. infantum*) e tem como medidas de controle preconizada pelo Ministério da Saúde/Brasil a eutanásia do cão doente, principal reservatório do parasito. Diante do impacto social que este procedimento causa perante a sociedade, o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC faz-se necessário e torna uma importante medida de controle da transmissão do parasito ao homem. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de partículas submicrômicas do polímero ácido poli-*D,L*-lático (PLA) e quitosana de baixo peso molecular, como carreadoras de antígenos vacinais contra leishmaniose visceral em modelo hamster. Neste contexto, foi realizado um ensaio pré-clínico vacinal com diferentes grupos experimentais, entre os quais: (i) Controle (solução salina estéril a 0,85%); (ii) Saponina (SAP; 100 µg/dose); (iii) Partícula Submicrométrica Pequena vazia (PSmP); (iv) Partícula Submicrométrica Grande vazia (PSmG); (v) Antígeno bruto de *Leishmania amazonensis* (LA); (v) Antígeno bruto *L. amazonensis* associado ao adjuvante saponina (LASAP); (vi) Partícula Submicrométrica Pequena contendo antígeno bruto de *L. amazonensis* (LAPSmP); e (vii) Partícula Submicrométrica Grande contendo antígeno bruto de *L. amazonensis* (LAPSmG). Dessa maneira, hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos foram inoculados com três doses, por via subcutânea, em intervalo de 21 dias. O desafio experimental foi realizado com 10^7 promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* (cepa C46), após 30 dias da última dose. Nos tempos T0 (Antes da 1º dose), T3 (30 dias após o terceiro inóculo) e T180 (180 dias após desafio experimental com *L. chagasi*, e imediatamente antes da eutanásia), foram feitas coletas de sangue dos animais por punção cardíaca, para realização de teste de função hepática e renal, hemograma e análise dos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Após a eutanásia dos animais, foram coletados baço e fígado para análise da carga parasitária pela técnica de diluição limitante. Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que o emprego do polímero poli-*D,L*-lático (PLA) de quitosana formulado em partículas submicrométricas associado ao antígeno bruto de *L. amazonensis* (formulações LAPSmP e LAPSmG) foram inócuos e seguros para administração em hamsters, além de serem imunogênicos e reduzirem drasticamente o parasitismo tecidual. Esta afirmação é baseada nos seguintes achados: (i) alterações locais e clínicas compatíveis com a manutenção dos animais; (ii) testes de função hepática e renal sem alterações; (iii) ausência de anemia e hemólise induzida durante o protocolo vacinal; (iv) indução de linfocitose após o término do protocolo vacinal, particularmente relacionada a formulação LAPSmG; (v) antigenicidade relacionada a produção de IgG total anti-*Leishmania* após o término do protocolo vacinal; (vi) redução do tamanho do baço, após o desafio experimental por *L. chagasi*, particularmente relacionada a formulação LAPSmG; (vii) redução da carga parasitária superior a 97% no baço e no fígado. Estes resultados indicam que o encapsulamento de antígeno bruto de *Leishmania* é uma estratégia que favorece o estabelecimento de imunogenicidade e a obtenção de elevados níveis de proteção contra a LV.

Abstract

Visceral leishmaniasis is caused by the parasite *Leishmania chagasi* (synonymous with *L. infantum*) and the euthanasia of the infected dog is the recommended method for preventing the spread of the disease according to the Brazilian Ministry of Health. Due to the social impacts that euthanasia has in society, the development of an anti-canine visceral leishmaniasis (CVL) vaccine becomes a necessary means of controlling the transmission of the parasite to humans. As such, the aim of this study was to evaluate the antigen-carrying potential of submicrometric particles composed of poly-*D,L* lactic acid (PLA) and chitosan with a low molecular weight, utilizing hamsters as the experimental model. In this context, we performed a preclinical study of potential vaccines applied in different experimental groups: (i) Control group (sterile saline solution at 0,85%); (ii) saponin (SAP; 100 µg/dose); (iii) small, empty submicrometric particles (PSmP); (iv) large, empty submicrometric particles (PSmG); (v) crude *L. amazonensis* antigen associated with saponin adjuvant (LASAP); (vi) small submicrometric particles containing crude *L. amazonensis* antigen (LAPSmP) and (vii) large submicrometric particles containing the crude *L. amazonensis* antigen (LAPSmG). Male hamsters (*Mesocricetus auratus*) were inoculated with three subcutaneous doses of the vaccines in intervals of 21 days. The experimental injections were performed with 10^7 *L. chagasi* promastigotes (C46 **strain**) in stationary phase, 30 days following the first dose of the vaccine. In the time points T0 (prior to the first dose of the vaccine), T3 (21 days following the third inoculation of the promastigotes) and T180 (180 days following the experimental injection and right before euthanasia), blood samples were collected from the animals straight from within the heart. The blood samples were used for performing tests on renal and hepatic function, hemograms and for analyzing the levels of anti-*Leishmania* IgG. After animals euthanasia, spleen and liver samples were collected for analyzing the parasitic load through the limiting dilution technique. The data showed that the utilization of the poly-*D,L* lactic acid polymer (PLA) and chitosan formulated into submicrometric particles associated with the crude antigen of *L. amazonensis* (LAPSmP and LAPSmG formulations) were innocuous and safe for administration in hamsters in addition to being immunogenic and drastically reducing the parasite load. This results is based on the following statements: (i) local and clinical alterations compatible with the maintenance of the animals; (ii) tests showing unaltered hepatic and renal function; (iii) the lack of anemia and hemolysis induced during the vaccination protocol; (iv) lymphocyte induction following the end of the vaccination protocol; (v) antigenicity related to the total anti-*Leishmania* IgG; (vi) reduction in spleen size, particularly associated with the LAPSmG formulation; and (vii) a reduction of more than 97% of the parasitic load in the liver and spleen. These findings indicate that the encapsulated *Leishmania* crude antigens were able to establish a prominent immunogenicity inducing a high protection levels against visceral leishmaniasis.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais associados a infecção pelo gênero *Leishmania* e leishmanioses

A leishmaniose é uma protozoose causada por espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*. Com base nos principais sintomas e sinais clínicos apresentados por pacientes humanos infectados, a doença pode ser classificada em três grupos: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC).

A LV é a forma mais grave da doença, é causada pela *Leishmania (Leishmania) donovani*, (LAVERAM e MESNIL, 1903), *Leishmania (L.) infantum*, (NICOLLE, 1908) ambas do Velho Mundo, e *Leishmania (L.) chagasi* do Novo Mundo. Embora as espécies *Leishmania (L.) chagasi* e *Leishmania (L.) infantum* apresentem nomes e localizações geográficas distintas, são consideradas a mesma espécie (MAURICIO *et al.*, 2000). Atualmente observa-se que cerca de 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair leishmaniose e que 1,6 milhões de novos casos são passíveis de ocorrer por ano, no mundo. No Brasil, a forma visceral está presente em 21 estados (HARHAY *et al.* 2011), e, desde a década de 70, observa-se uma crescente tendência a urbanização da enfermidade, devido a maior adaptação dos vetores em se desenvolver nos grandes centros. Além disso, existe uma alta prevalência de cães infectados que são considerados como hospedeiros vertebrados, de maior importância epidemiológica na transmissão da doença (MINISTERIO DE SAUDE BRASIL, 2006).

A LC pode ser causada por *L. tropica*, *L. aethiopica* no velho mundo, e por *L. mexicana*, *L. major*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, entre as mais estudadas, no Novo Mundo. O número de casos de LC é de cerca de 1-1.500.000 anuais, e 90% dos casos ocorrem principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como: Afeganistão, Argélia, Síria, Irã, Peru, Arábia Saudita e Brasil (ALVAR *et al.*, 2012; REITHINGER *et al.*, 2007).

No Brasil, as principais espécies de *Leishmania spp.* associadas a esta doença são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, e *L. (Leishmania) amazonensis*. Destas, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* podem causar Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), relatada em todas as regiões do país, com uma média de 28, 568 casos anuais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2007).

As espécies causadoras da forma visceral são transmitidas por insetos do gênero *Phlebotomus* no velho mundo (África, Ásia e Europa) e pelo gênero *Lutzomyia* no novo mundo (Américas). As fêmeas infectadas por *Leishmania* destes insetos fazem o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados e, dessa forma, regurgitam formas promastigotas metacíclicas em sua pele (SACKS, 1989). Estas formas promastigotas são fagocitadas por células residentes ou por células que são recrutadas para o local da infecção. Entretanto, nos macrófagos os parasitos conseguem sobreviver, diferenciando-se de promastigotas para amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo. As formas amastigotas sofrem sucessivas divisões binárias simples longitudinal até ocorrer a ruptura do macrófago, quando estas formas são liberadas para o sangue ou fluido intersticial, podendo ser ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do hospedeiro invertebrado, as formas amastigotas são diferenciadas em formas promastigotas e através da metaciclogênese se transformam em promastigotas metacíclicas que ao serem regurgitadas no hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo, podem infectar um novo hospedeiro vertebrado (SACKS, 1989; KAYE *et al.*, 2011). As espécies da forma visceral se propagam sistemicamente em macrófagos de órgãos internos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea, causando uma série de alterações sistêmicas e locais (KUMAR e NYLEN, 2012).

Considerando a crescente expansão da LV no Brasil e as características epidemiológicas da doença, é necessário o desenvolvimento de medidas que limitem a transmissão da doença. Embora muitos compostos recentemente propostos apresentem efeito positivo no combate a leishmaniose, o tratamento atualmente preconizado no Brasil é a utilização de múltiplas injeções de antimoniais pentavalentes, que invariavelmente produzem graves efeitos secundários e tóxicos. O problema é ainda agravado pelo fracasso terapêutico juntamente com o surgimento de resistência ao antimonial (CROFT *et al.*, 2006).

Muitos aspectos imunológicos da doença têm sido estudados em modelos experimentais, tais como camundongos, hamsters, cães e primatas não-humanos (HANDMAN, 2001). A maioria dos modelos experimentais empregados no estudo da leishmaniose são utilizados em estudos destinados ao desenvolvimento de medicamentos e vacinas contra as leishmanioses (HANDMAN, 2001). Neste contexto, cabe ressaltar

que o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é altamente susceptível a infecção por cepas de *Leishmania spp.* e tem sido amplamente utilizado como um modelo para o estudo da LV (GOTO *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA GOMES *et al.*, 2011, MOREIRA *et al.*, 2012). Estas características justificam o uso deste modelo em estudos associados à clínica, a vacinação e a quimioterapia de protocolos experimentais (GOMES-SILVA *et al.*, 2013; RIBEIRO-ROMÃO *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose é um objetivo de longo prazo, tanto na medicina humana, quanto na veterinária (LIEW *et al.*, 1987). Apesar dos recentes avanços em imunologia molecular e a no campo farmacêutico, não existe nenhuma vacina disponível para atuar no combate a transmissão da leishmaniose, preconizada pelo Ministério da Saúde (MINISTERIO DE SAUDE BRASIL, 2006). O encapsulamento de antígenos em nanopartículas tem sido proposto para direcionar seletivamente antígenos vacinas para as células apresentadoras de antígenos (APC), de modo que aumente a imunogenicidade vacinal (AMIDI *et al.*, 2009). Esta estratégia seria particularmente interessante em vacinas contra patógenos que ainda não são capazes de conferirem elevados níveis de proteção, como é o caso das vacinas contra a leishmaniose visceral canina (LVC) (REIS *et al.*, 2010).

2. Revisão de Literatura

2.1 A resposta imune anti-*Leishmania*

De forma interessante, durante o estabelecimento da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, as formas promastigotas metacíclicas localizadas no local do repasto sanguíneo, estimulam o recrutamento de mais células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) para este local, favorecendo a etapa inicial do ciclo biológico deste protozoário (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Nesta direção, uma vez que os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local da infecção, sugere-se que possam atuar como células hospedeiras intermediárias, e que sejam utilizados pelos parasitos para entrar silenciosamente nos macrófagos, evitando assim uma possível ativação celular (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual os parasitos evitam o processo de fagocitose envolve processo de modulação da resposta imune inata e adaptativa, que culmina na diminuição da função microbicida do macrófago (anergia). Desta forma, os macrófagos ao apresentarem capacidade fagocítica comprometida, podem ser utilizados como abrigo seguro para o crescimento dos parasitos (ALI *et al.*, 2014).

A resposta imune inata desempenha papel crítico na resposta a infecção por *Leishmania spp.* do hospedeiro, contra patógenos. Neste sentido, a resposta inata participa do controle de infecções causadas por patógenos, tais como *Leishmania spp.*, utilizando receptores celulares de reconhecimento tipo Toll (TLRs) e de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) tais como, glicolípidios, peptideoglicanos e lipopeptídeos, comuns a um grande grupo de microrganismos. TLR é responsável por mediar o padrão de resposta que leva ao aumento do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da IL-12 e do óxido nítrico, que são mediadores associados a resposta protetora na leishmaniose. Dentre os 11 membros da família TLR, os receptores do tipo TLR4 e TLR9 contribuem de forma substancial na resposta imunológica contra a infecção por *Leishmania spp.* Sendo assim, sugere-se que estes receptores também possam desempenhar um importante papel como alvo de candidatos vacinais contra a infecção por *Leishmania spp.*, bem como durante a ação de fármacos que visam causar a destruição do parasito (MUKHERJEE *et al.*, 2012). Além disto, os receptores do complemento (CR1, CR3), o receptor de fibronectina, e o receptor de fucose-manose (MR) na superfície

de macrófagos desempenham papéis de ligação/fixação de promastigotas (KANE e MOSSER, 2000). As promastigotas metacíclicas de *L. infantum* usam CR3 para entrar nos macrófagos e, desta forma, não desencadeiam a ativação da NADPH-oxidase e subsequente colapso respiratório na membrana do fagossoma, contrariamente ao observado caso utilizassem o receptor MR, o qual é capaz de desencadear a resposta inflamatória (LINEHAN *et al.*, 2000).

Nas promastigotas, os lipofosfoglicanos (LPG), gp63 e o proteofosfoglicano (PPG) presentes na superfície do parasito são determinantes para a sobrevivência do parasito (MCCONVILLE *et al.*, 1991). Estes receptores constituem as moléculas alvo no processo de opsonização, que conseqüentemente levaria a destruição do parasito. No entanto, interessantemente, estes receptores são utilizados no processo de entrada do parasito na célula hospedeira (fagocitose) (GREEN *et al.*, 1994; BRITTINGHAM e MOSSER, 1996; KAMHAWI *et al.*, 2004).

A resposta celular polarizada do tipo Th1, descrita em modelo murino, protege os animais contra a infecção por *Leishmania*, enquanto a resposta imune Th2 favorece a manutenção da infecção (SACKS *et al.* 2002). Esta informação está de acordo com a resposta imune observada em vários estudos experimentais e clínicos, nos quais foram observados que a produção das citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α (resposta polarizada Th1) conferem proteção contra a leishmaniose (ROBERTS *et al.*, 2005). Por outro lado, as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, bem como o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), estão relacionadas com a susceptibilidade a infecção por *Leishmania* (CHOUDHURY *et al.*, 2013). Os estudos sobre a polarização da resposta imune celular e a associação com a patogênese da leishmaniose vêm subsidiando a identificação de biomarcadores relacionados a resistência/susceptibilidade, sendo utilizados nas avaliações de candidatos vacinais anti-*Leishmania* (CHOUDHURY *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos experimentais são baseados em modelos de animais tais como camundongos, hamsters e cães, que são capazes de reproduzir, mesmo que parcialmente, a infecção humana por *Leishmania spp.* (HANDMAN, 2001). Dentre os modelos experimentais adotados para a infecção experimental, o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) apresenta-se altamente susceptível a infecção por *Leishmania*, além de mimetizar os sinais clínicos apresentados na infecção humana (LT e LV) e canina

(LV) (De OLIVEIRA-GOMES *et al.*, 2011, MOREIRA *et al.*, 2012). Neste sentido, recentemente, foi demonstrado que o hamster dourado é também um modelo apropriado para estudos relacionados a imunopatogênese causada por *L. (V.) braziliensis*, pois desenvolve lesões crônicas na pele que se assemelham clínica e histopatologicamente às dos seres humanos (GOMES SILVA *et al.*, 2013; RIBEIRO-ROMÃO *et al.*, 2014). Entretanto, a utilização de hamsters ainda é limitada devido à escassez de reagentes (por exemplo, anticorpos, citocinas e marcadores de células) disponíveis para estudar a resposta imune na leishmaniose (GUPTA, 2011).

Buscando superar a dificuldade de reagentes imunobiológicos para hamsters, MELBY *et al.* (1998) avaliaram a resposta imune na LV empregando-se genes codificantes para citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias/reguladores (IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12 e TGF- β). Neste trabalho observou-se acentuada expressão dos RNAm das citocinas associadas a resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) uma semana após a infecção. Surpreendentemente, a expressão de IL-4 não aumentou em resposta à infecção com *L. donovani* como seria esperado. Além disto, os níveis de IL-12 apresentaram expressão em níveis baixos a partir de sete dias pós-infecção, assim como o observado para IFN- γ (MELBY *et al.*, 1998). Além disso, o RNAm associado a transcrição de TNF- α aumentou após uma semana de infecção, mantendo-se estável ao longo do primeiro mês de infecção. Observou-se ainda que a expressão de IL-10, um potente inibidor da atividade funcional de macrófagos, aumentou localmente no baço ao longo das primeiras quatro semanas após a infecção. Esta citocina foi associada a progressão da doença em hamsters e este estudo constitui o primeiro estudo descritivo sobre a imunopatogênese molecular da leishmaniose em hamsters (MELBY *et al.*, 1998).

Do ponto de vista parasitológico, a progressão da leishmaniose visceral em hamsters é acompanhada pelo aumento da carga parasitária no fígado, baço, e na medula óssea (GOTO *et al.*, 2009). O fracasso em controlar o parasitismo na LV pode ser parcialmente explicado pelo processo de supressão linfoproliferativa atribuído à incapacidade das células apresentadoras de antígeno (APC) em estimular as células T específicas durante a progressão da doença (MOOKERJEE *et al.*, 2003; GOTO *et al.*, 2009). Além disto, a produção de TGF- β na LV estimula a apoptose de linfócitos e a diminuição da atividade de proteína quinase C (MOOKERJEE *et al.*, 2003). Assim sendo, a progressão da doença em hamster tem sido relacionada com a perda de funções efetoras

de macrófagos (McMAHOM-PRATT, *et al.*, 2004). De fato, ao longo do curso da infecção, o iNOS e NOS₂ no fígado e no baço não foi detectada. Estudos complementares mostraram que a falta de produção de NO está relacionada a inativação da transcrição de NOS₂, IFN- γ a níveis basais (PEREZ *et al.*, 2006).

2.2 O modelo hamster utilizado em vacinas anti-Leishmaniose

A infecção experimental por *Leishmania spp.* no modelo hamster auxilia em muitos aspectos o entendimento da leishmaniose Visceral (LV) canina e humana. Observou-se que algumas características da infecção tais como pancitopenia caracterizada por leucopenia, anemia, caquexia, hipergamaglobulinemia, e incapacidade das células apresentadoras de antígeno infectados (APC) em estimular as células T específicas são comuns a estes hospedeiros (MATHIAS *et al.*, 2001). Esta última disfunção tem sido atribuída à incapacidade das células apresentadoras de antígeno (APC) em estimular as células T (FRUTH *et al.*, 1993). Vários pesquisadores têm considerado essa disfunção fundamental na progressão da LV no modelo hamster e consideram que este fato também poderia desempenhar um papel importante na doença humana e canina (NIETO *et al.*, 2011; VASCONCELLOS *et al.*, 1996). Estes fatos tornam o hamster o modelo experimental para triagem de candidatos vacinais extremamente interessante, em virtude da elevada susceptibilidade a infecção por *Leishmania*.

Nesse sentido, diferentes autores têm realizado ensaios pré-clínicos vacinais anti-*Leishmania* utilizando o hamster como modelo experimental (GOMES *et al.* 2008; BAHARIA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015; JAISWAL *et al.*, 2015; JAISWAL *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2014; KUSHAWAHA *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, (2006); MAZUMDAR *et al.*, 2005; TONUI *et al.*, 2003).

Os principais desafios no desenvolvimento de vacina contra a leishmaniose visceral são: custos dos medicamentos e surgimento de resistência aos mesmos, pelo que muitos cientistas estão fazendo esforços para investigar vacinas capazes de gerar imunidade de longa duração. Ainda não há um candidato a vacina capaz de fornecer o nível de proteção necessário para controle da doença. No entanto, o aumento do conhecimento adquirido nos últimos anos em todas as áreas para renovar os esforços para

fazer e testar novas vacinas e adjuvantes destinadas a prevenir ou tratar a doença. Neste sentido, é importante mencionar os trabalhos feitos em modelo hamster.

Dentre os estudos para teste de candidatos vacinais anti-*Leishmania* em hamsters destaca-se o de GOMES *et al.* (2008), que avaliou um plasmídeo de DNA codificante para uma proteína salivar de *L. longipalpis* (LJM19). Os resultados sugerem que o candidato vacinal apresentou eficácia parcial, embora os animais tenham apresentado redução na carga parasitária e perfil hematológico normal, houve elevada mortalidade entre dois e cinco meses após o desafio experimental com *L. chagasi* (GOMES *et al.*, 2008).

Também é importante mencionar o trabalho realizado por BAHARIA *et al.*, (2015) no desenvolvimento de uma vacina que confira imunidade de longa duração contra a leishmaniose visceral (VL). Foi identificado através de imunoproteômica o LdSir2RP de lisado solúvel de *Leishmania donovani* como um estimulador de uma resposta Th1. O Sir2 (sirtuinas) são dependentes de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), importante na sobrevivência celular, envelhecimento e apoptose. Foi avaliada em hamsters (*Mesocricetus auratus*) onde foi observado uma estimulação da produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , mas não de IL-4 e IL-10. Os hamsters vacinados com a proteína recombinante rLdSir2RP associada ao adjuvante BCG resistiram ao desafio *L. donovani* em 75% e gerou forte resposta tipo Th1 mediada por IL-12 e IFN- γ . Além disso, a eficácia foi ainda apoiada por um aumento notável no nível de anticorpo IgG2, que é indicativo de uma resposta protetora do tipo Th1 (BAHARIA *et al.*, 2015).

Neste sentido vários antígenos intracelulares de *Leishmania* foram identificados a fim de encontrar uma potencial vacina capaz de conferir proteção duradoura contra a infecção, como as proteínas histonas e ácido ribossomal, que já foram testadas no modelo camundongo contra leishmaniose cutânea, e induziram uma resposta imune eficaz e com sucesso (PEREIRA *et al.*, 2015). Foi também avaliada a capacidade protetora de histonas (HIS) e proteína ácida ribossomal (LiP0) contra a infecção de *L. infantum* no modelo hamster onde os resultados sugerem que a vacinação com o antígeno de *L. infantum* LiP0 administrada numa formulação de DNA pode ser considerado um componente potencial de uma formulação de vacina com um perfil de citocinas equilibrada pró-inflamatórias contra a leishmaniose visceral (PEREIRA *et al.*, 2015).

Também é importante mencionar os estudos de caracterização proteômica em frações localizadas no citosol de amastigotas de *L. donovani* no baço, em indivíduos curados de *Leishmania*, que levou à identificação de *tryparedoxin* peroxidase (LdcTryP) e chaperoninas-TCP20 (LdTCP20) como proteínas estimuladoras de resposta tipo Th1. Quando avaliadas em hamsters as proteínas recombinantes purificadas (rLdcTryP e rLdTCP20) induziram a produção de óxido nítrico. Do mesmo modo geraram citocinas do tipo Th1 (IFN- γ / IL-12). Além disso, a vacinação com rLdcTryP provocou resposta de hipersensibilidade do tipo retardado e mostrou boa eficácia profilática (78%) contra desafio de *L. donovani* em hamsters. No entanto, os animais vacinados com rLdTCP20 exibiram menor eficácia profilática (55%). Os resultados indicam o potencial da proteína rLdcTryP como uma vacina anti-leishmaniose (JAISWAL *et al.*, 2015).

Outro estudo realizado por JAISWAL *et al.*, (2014) identificou proteínas estimuladoras da resposta tipo Th1 como triose-fosfato isomerase (TPI), proteína dissulfeto isomerase (PDI) e do fator-2 de alongamento (EL-2) incluindo proteína de choque térmico 70 (HSP70) de *L. donovani* para induzir resposta Th1 em hamster. A proteína recombinante rLdHSP70 sozinha provocou fortes respostas celulares e regulação positiva do IFN- γ e IL-12, e níveis mais baixos de IL-4 e IL-10. Além disso, entre as várias combinações a rLdHSP70 + rLdPDI mostrou melhora na resposta celular, seguidas por rLdHSP70 + rLdEL-2. Estas combinações foram avaliadas quanto ao seu potencial de proteção, onde a associação rLdHSP70 + rLdPDI conferiu proteção máxima (80%), seguido por rLdHSP70 + rLdEL-2 (75%) com aumento significativo nos níveis de transcrição de iNOS, IFN- γ , IL-12 e anticorpo IgG2 em animais vacinados (JAISWAL *et al.*, 2014).

GUPTA *et al.*, (2014) analisou as proteínas recombinante enolase (LdEno) e aldolase (LdAld) clonadas e purificadas com sucesso. A avaliação dos potenciais profiláticos revelou 90% de diminuição na carga parasitária em hamsters vacinados com rLdEno contra o desafio por *Leishmania*, por um aumento nos níveis de iNOS, IFN- γ , TNF- α e IL-12 e de expressão de transcritos de RNAm junto com extrema regulação de TGF- β , IL-4 e IL-10. No entanto, os animais vacinados com rLdAld mostraram menor eficácia (65%).

KUSHAWAHA *et al.*, (2012), realizou um estudo com uma enzima glicolítica (triose fosfato-TPI) identificada através de proteômica de uma fração do antígeno

solúvel de *L. donovani* com 89,9 - 97,1 kDa. Foi avaliada a proteína TPI (LdTPI) de *L. donovani*, onde esta foi clonada, expressa e purificada (rLdTPI) e exibiu homologia de 99% com TPI de *L. infantum*. Ele induziu a produção de NO em hamsters e estimulou respostas celulares do tipo Th1, incluindo IFN- γ e IL-12, baixos níveis de IL-10, IL4 e aumento do anticorpo IgG2 anti-*Leishmania* (KUSHAWAHA *et al.*, (2012).

De acordo com estudos feitos por SHARMA *et al.* (2006), os antígenos solúveis de promastigotas de *L. donovani* foram encapsulados em lipossomas de fosfatidilcolina (escheriosomes) preparados a partir de lipídios de *E. coli*. A vacina à base de escheriosome foi avaliada quanto ao seu potencial de desencadear uma resposta imunitária protetora experimental contra a leishmaniose visceral. A administração da vacina induziu forte resposta humoral, assim como resposta imune mediadas por células tanto em hamsters quanto em camundongos BALB/c (SHARMA *et al.*, 2006).

Em um estudo, feito por MAZUMDAR *et al.*, (2005) foram avaliados o efeito de fosfolipídios como adjuvante e a eficácia protetora de lipossomas como veículos, contra a leishmaniose visceral (LV) no modelo hamster. Foram avaliados lipossomas preparados com disteariol derivado de L-alfa-fosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoil (DPPC) e dimiristoil (DMPC). Os lipossomas DPPC e DMPC estimularam respostas de hipersensibilidade retardada (DTH) e foi observada forte DTH em lipossomas DSPC (95% de proteção) e nenhuma proteção em lipossomas DPPC e DMPC 4 meses após o desafio com *L. donovani* (MAZUMDAR *et al.*, 2005).

Adicionalmente, outros estudos avaliaram a eficácia do lipofosfoglicano (GLP) derivado de *L. donovani*, associado ao adjuvante *Bacilo de Calmette-Guerin* (BCG) como candidato a vacina contra a leishmaniose visceral em camundongos BALB/c e hamster (*Mesocricetus auratus*). No estudo, utilizaram uma dose total de BCG (150 μ L) mais 60 μ L ou 30 μ L de GLP para hamsters e camundongos BALB/c, respectivamente. Não foram observados efeitos colaterais visíveis no local de inoculação e sistemicamente; o que implica que a molécula era segura a esta de dosagem. Os animais vacinados apresentaram ativação de resposta humoral, mediada por células para o GPL, que se correlacionava com a resistência contra a doença. Além disso, a proteção por GLP mais BCG, foi, no entanto, ruim para o restante dos animais imunizados, que apresentaram progressão da doença, ilustrado por emagrecimento, perda de massa e a parasitemia

esplénica elevada em hamsters. Estes dados sugerem que pode-se avaliar o potencial de GPL como uma vacina candidata contra a leishmaniose, associado a outros adjuvantes que podem aumentar a sua imunogenicidade (TONUI *et al.*, 2003).

2.3 Adjuvantes em vacinas contra as leishmanioses e nanoformulações

O desenvolvimento de uma vacina eficaz requer informação precisa sobre o adjuvante para ser utilizado e a formulação específica que a torne estável, segura e imunogênica (MUTISO *et al.*, 2010). Os adjuvantes são compostos que servem para aumentar a magnitude e a qualidade da resposta imune contra antígenos específicos que são co-inoculados (DUBENSKY *et al.*, 2010; AGUILAR *et al.*, 2007).

Os adjuvantes utilizados na vacinação contra a leishmaniose são divididos em duas categorias (MUTISO *et al.*, 2010):

(i) Adjuvante não-particulado ou imunoestimulante, incluindo micro-organismos inteiros ou de suas partes como produtos bacterianos naturais/artificiais (monofosforil-lípido A (MPL), muramil di- ou tripeptídeos e derivados (MDP, MTP), RC-529, saponinas (QuilA, QS21), citocinas (IL-2, IL-12, GM-CSF), os oligonucleotídeos CpG, glicano, imiquimod, e combinações dos mesmos.

(ii) Adjuvantes particulados que consistem em sistemas de entrega baseados em partículas, tais como emulsões, lipossomas e microesferas poliméricas, que favorecem o endereçamento dos antígenos de *Leishmania* para as APC.

Vale ressaltar que os adjuvantes particulados, além de favorecer a fagocitose de antígenos pelas APC (AMIDI *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2009), também podem aumentar a estabilidade de peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos (PALIWAL *et al.*, 2008).

Ao se optar pelo uso do encapsulamento antigênico formulado em micro ou nanopartículas, propriedades físico-químicas como o tamanho e carga superficial são fundamentais no direcionamento da vacina para as APC. Neste sentido, nanopartículas com diâmetro de 100nm ou menores são ideais para a formulação vacinal, pois favorecem o estabelecimento de imunogenicidade (OYEWUMI *et al.*, 2010). Assim, estudos indicam que o tamanho do adjuvante entre o intervalo de 200-600nm favorece o estabelecimento de resposta imune Th1 (KANCHAN *et al.*, 2007). Por outro lado, a

imunização com partículas entre 2-8 μ m induz uma resposta Th2 (MANN, *et al.*, 2009). O tamanho das nanopartículas para o estabelecimento de uma resposta imune compatível com a proteção, utilizando antígenos de *Leishmania*, foi descrito como ideal quando estiver com dimensões entre 100nm a 500nm (DOROUD *et al.*, 2012). Além disto, as nanopartículas responsáveis por tornar a fagocitose mais eficiente tem sua ação potencializada quando carregadas positivamente e apresentarem forma esférica ou cilíndrica (CHAMPION *et al.*, 2006).

Cabe ainda ressaltar que as nanopartículas poliméricas, especialmente as mais biodegradáveis e biocompatíveis são aprovadas para uso em seres humanos e amplamente estudadas para formulações de vacinas. As vantagens da utilização de polímeros biodegradáveis incluem segurança, disponibilidade e biocompatibilidade. Além disso, a capacidade de controlar o tempo de liberação do antígeno e a taxa de degradação do polímero também favorecem uma melhor resposta imune quando o objetivo é a vacinação (KERSTEN *et al.*, 2004).

Neste contexto, as nanoesferas PLGA (poli ácido láctico-co-glicólico) encapsuladas com antígeno isolado de *L. major* em combinação com adjuvante saponina (*Quillaja saponina*; QS) foram utilizados para imunizar camundongos BALB/C contra a infecção por *L. major* (TAFAGHODI *et al.*, 2010). Foi observado neste estudo maior taxa de proteção nos camundongos imunizados com as nanoesferas associadas ao antígeno de *L. major* [(ALM+QS) PLGA]. Diferentes estudos têm mostrado resultados promissores associados ao uso do poli (ácido láctico - PLA) na formulação de vacinas (DIWAN, *et al.*, 2002; TAFAGHODI, *et al.*, 2010).

As saponinas são os adjuvantes mais amplamente utilizados em ensaios vacinais contra LV (RAVINDRAN e ALI, 2004; GIUNCHETTI *et al.*, 2007; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012). Este adjuvante é capaz de aumentar o recrutamento de células para o local do inóculo e, além disto, é capaz de induzir aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-2, IL-6 e IL-4). Além disso, a saponina apresenta baixo custo, requer pouca manipulação ao ser formulada, sendo licenciada para uso veterinário (COX e COULTER, 1997).

2.4 Candidatos vacinais contra a leishmaniose visceral

Tradicionalmente as vacinas apresentam grande impacto para a melhoria da saúde humana. Por esta razão, diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo têm concentrado esforços em caracterizar diferentes candidatos vacinais contra os mais distintos patógenos que assolam a saúde humana. Nesta direção, ao se considerar toda a epidemiologia da leishmaniose no Brasil e no mundo, considera-se urgente o desenvolvimento e o entendimento dos mecanismos de ação dos diferentes candidatos vacinais. De um modo geral, os imunobiológicos contra a leishmaniose são divididos em vacinas de primeira, segunda e terceira gerações, como descritos a seguir.

As vacinas de primeira geração são compostas por parasitos mortos ou vivos atenuados (MODABBER, 1995). Assim a primeira vacina contra a leishmaniose, popularmente conhecido como "leishmanização", foi desenvolvida no início dos anos 1940 e tem sido usado por mais de 60 anos em vários países (Irã, Uzbequistão), (GAVRON, 1997). O processo de leishmanização foi interrompido devido a questões de segurança, e seu uso no momento é limitado a uma vacina registada no Uzbequistão e a ensaios em seres humanos no Irã (TABBARA *et al.*, 2005; KHAMESIPOUR *et al.*, 2006).

A vacinação com parasitos que são atenuados, tem grandes vantagens pois são geralmente absorvidos pelas células hospedeiras de um modo semelhante aos parasitos virulentos, e persistem durante algum tempo sem replicar. Isso permite que o hospedeiro tenha respostas imunes robustas contra os antígenos do parasita (KEDZIERSKI *et al.*, 2006). As primeiras tentativas de desenvolvimento de atenuação com cepas de *Leishmania* foram realizadas *in vitro* utilizando diferentes processos nos quais os parasitos foram submetidos a irradiação, a mutagênese química, a diferença de temperatura ou pressão de seleção, ao acrescentar mutações geneticamente poderia levar à perda de eficácia (STREIT *et al.*, 2001).

Outra abordagem é a introdução de "genes" mutantes no genoma de *Leishmania*, incluindo genes sensíveis a drogas para controlar a infecção (MUYOMBWE *et al.*, 1998). Recentemente, a vacinação de hamsters com mutantes de *L. amazonensis* resultou em redução de 99% na carga de parasitos e suprimiu o desenvolvimento da doença acompanhada por um aumento de hipersensibilidade do tipo retardada, aumento dos

níveis NOS, IFN- γ e IL-12 (KUMARI *et al.*, 2009).

A vacinação com antígenos brutos de parasitos remonta ao início da década de 40 e foi iniciada por cientistas brasileiros. Nesta direção MAYRINK *et al.* (1985) desenvolveram uma vacina utilizando antígenos brutos de parasitos, composta por cinco isolados de *Leishmania*. Esta vacina mostrou ser segura e imunogênica, entanto, apresentou pequeno grau de proteção (50%) contra a leishmaniose tegumentar humana (MAYRINK *et al.*, 1985).

ARAÚJO *et al.* (2008) e ARAÚJO *et al.* (2011) descreveram a resposta imune em cães induzida pela vacina “Leishvaccine” pelo grupo do Prof. Mayrink. Nestes estudos foram observadas alterações na imunidade inata, mediada por neutrófilos e eosinófilos, além de ativação de células T CD4+ e CD8+, com a presença de um perfil misto de citocinas (IFN- γ e IL-4).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando formulações vacinais anti-LVC, e desenvolveu o imunobiológico LBSap, que possui em sua composição antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina (GIUNCHETTI *et al.*, 2007). Esta vacina foi patenteada e está inscrita no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com a identificação PI 0601225-6. A vacina LBSap é capaz de controlar a carga parasitária após infecção por *L. chagasi* em diferentes modelos experimentais (ROATT, 2010; MOTTA, 2011; MENDONÇA, 2011; RESENDE, 2011; ROATT *et al.*, 2012). Em cães, a redução da carga parasitária atingiu 54% no baço (ROATT *et al.*, 2012), enquanto em camundongos BALB/c a redução foi de 62% no baço após desafio com *L. chagasi* (MENDONÇA, 2013). Estes resultados demonstram que cepas dermatotrópicas de *Leishmania* apresentam alto potencial em induzir imunogenicidade e de promover o controle do parasitismo em diferentes órgãos (GIUNCHETTI *et al.*, 2007, MENDONÇA, 2013).

É importante destacar ainda que vacinas de 1º geração, como a vacina LBSap, apresentam maior estabilidade e segurança com relação às vacinas de subunidades purificadas (2º geração) e de DNA (3º geração), tornando o seu custo mais acessível aos países em desenvolvimento (GIUNCHETTI *et al.*, 2007, GIUNCHETTI *et al.*, 2008a, GIUNCHETTI *et al.*, 2008b).

Considerando a experiência prévia de nosso grupo de pesquisa, que tem se dedicado a triagem de novas formulações vacinais contra a LVC, este trabalho se propôs

a ampliar os estudos de cepas dermatotrópicas, como racional para o desenvolvimento de uma vacina imunoprotetora contra a forma visceral. Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar em hamsters sírios dourados da espécie *Mesocricetus auratus*, formulações vacinais contendo antígeno de *L. amazonensis* encapsulado em partículas submicrométricas, frente à infecção experimental por *L. chagasi*.

A segunda geração de vacinas foi baseada em subunidade recombinantes utilizando bactérias e vírus modificados geneticamente transportando genes codificantes de antígenos de *Leishmania*, bem como frações purificadas do parasito (GURUNATHAN *et al.*, 1997). Neste grupo de vacinas está incluído o candidato vacinal composto pela proteína recombinante da gp63 expressa em *E. coli*. A eficácia desta proteína foi avaliada em vários modelos experimentais (RIVIER *et al.*, 1999), sem induzir proteção contra a infecção por *L. major* (HADMAN *et al.*, 1990).

A glicoproteína de membrana gp46/H2 pertence a uma família de genes expressos na maioria das espécies de *Leishmania* (SYMONS *et al.*, 1994) e foi avaliada em camundongos, onde induziu a produção de IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* (CHAMPSI *et al.*, 1988) e proteção entre 28-50%, após o desafio por *L. amazonensis* (MCMAHON-PRATT *et al.*, 1992).

As cisteíno proteinases como catepsina L (CPs) são importantes candidatos vacinais, uma vez que são predominantemente expressos e são ativos nos lisossomos de amastigotas. Estas proteinases pertencem à superfamília papaína e constituem alvos atraentes de drogas capazes de diminuir a sobrevivência e a replicação do parasito, (MCKERROW *et al.*, 1999). As CPs têm uma grande importância biológica, como potenciais candidatos a vacinas contra *Leishmania donovani* (AMRITA *et al.*, 2014). As CPs do tipo I, II e III, presentes em lipossomas catiônicos com receptor tipo Toll (TLR) mostraram-se eficazes contra infecção por *L. donovani* no modelo hamster, com proteção entre 93 - 98% (AMRITA *et al.*, 2014). Neste estudo, ficou documentado que o mecanismo de proteção esteve associado a produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , com regulação negativa de TGF- β , IL-10 e IL-4 (AMRITA *et al.*, 2014).

O candidato a vacina de segunda geração mais estudado foi o ligante fucosemanose (FML), isolado de *L. donovani* e descrito por PALATNIK *et al.* (1989). Este antígeno foi descrito na superfície do parasito ao longo de todo o seu ciclo de vida, e se destacou por inibir a internalização dos parasitos em macrófagos *in vitro* de várias

espécies de *Leishmania* (PALATNIK *et al.*, 1989). O potencial profilático da vacina com FML foi testado juntamente com a saponina e com o hidróxido de alumínio como adjuvantes. Os resultados mostraram que houve taxa de proteção significativa acompanhada de maior produção de IgG em camundongos BALB/c e em hamsters (PALATNIK DE SOUSA *et al.*, 1994). O antígeno FML demonstrou seu potencial imunoprofilático contra a leishmaniose visceral em hamster com uma taxa de redução da carga parasitária de 87,7%, 84,4% em camundongos BALB/c e 85 - 93% em camundongos albino Swiss (PALATNIK DE SOUSA *et al.*, 1994). O antígeno FML foi licenciado com o nome de Leishmune[®], e esteve disponível para comercialização no Brasil em áreas onde a LVC é endêmica até o início de setembro de 2014, quando sua licença para comercialização foi suspensa.

Outro antígeno amplamente estudado foi o *LiESAP*-MDP que é uma proteína excretada de 53Kda obtida de formas promastigotas *L. infantum* na formulação com muramildipeptídeo - MDP (LEMESRE *et al.*, 2007). A imunização de cães com *LiESAP*-MDP conferiu alta taxa de proteção em modelos experimentais contra a infecção por *L. infantum*. A resposta imune após a vacinação foi correlacionada com ao tipo de resposta celular Th1 de longa duração como demonstrado por ensaios de reatividade e proliferação de linfócitos anti-*LiESAP* IgG2 (LEMESRE *et al.*, 2007). Em 2011 este antígeno foi licenciado na Europa onde é comercializado com o nome de CaniLeish[®] (Leishma News, 2011) para atuar contra a LVC. Essa vacina apresentou resposta protetora e gerou redução efetiva de carga parasitária em macrófagos infectados (MORENO *et al.*, 2012). Em estudo recente, confirmou-se o efeito imune eficiente prolongado gerado pela vacina CaniLeish[®] um ano após a imunização (MARTIN *et al.*, 2014; MORENO *et al.* 2012).

Os antígenos P4, P8 e A2, presente em amastigotas, também foram usados como potenciais candidatos a vacinas anti-*Leishmania* (SOONG *et al.*, 1995). A proteína A2, expressa unicamente na fase amastigota de *Leishmania*, forma uma parte multigênica de uma família de pelo menos 11 genes sendo considerada como um fator de virulência necessário à sobrevivência do parasito. GHOSH *et al.* (2001) demonstraram que a imunização de camundongos com o antígeno recombinante A2 reduziu a carga parasitária no baço; sendo capaz de estimular a produção de IFN- γ e IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*, sugerindo uma resposta imune mista do tipo Th1 e Th2.

Outro estudo no qual o antígeno A2 foi utilizada em combinação com a saponina em cães mostrou indução da produção de IFN- γ , que foi associado a proteção frente ao desafio experimental com *L. chagasi* (FERNANDES *et al.*, 2008). Esta vacina foi licenciada em 2007 pelo MAPA (COELLO *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2015) para uso no Brasil contra a LVC, sendo denominada de Leish-Tech[®] (Hertape Calier, Juatuba, MG), sendo a única vacina disponível atualmente no Brasil.

A terceira geração de desenvolvimento de vacinas foi descrita com sendo baseada na injeção direta de DNA plasmidial codificante para antígenos vacinais e abriu novas perspectivas para a área da imunização. As vacinas de DNA apresentam vantagens, tais como facilidade de produção, alta estabilidade, facilidade de administração e elevada imunogenicidade (LIU *et al.*, 2006) com indução de resposta imune humoral e celular, particularmente relacionada a linfócitos T CD4+ e CD8+ (RESTIFO *et al.*, 2000).

A vacina de DNA mais estudada no modelo hamster utilizou a proteína de membrana do cinetoplasto-11 (KMP-11) (BASU *et al.*, 2005). Esta vacina conferiu proteção contra a infecção por *L. donovani* induzindo uma resposta mista Th1/Th2. Adicionalmente, observou-se que a administração concomitante da proteína KMP-11 com a citocina IL-12 em camundongos reforçou o perfil de imunidade protetora contra *L. chagasi*, no entanto suprimiu a proteção contra *L. donovani* (BASU *et al.*, 2005).

3. Justificativa

A leishmaniose visceral é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das seis maiores endemias de origem parasitária no mundo. Adicionalmente, a doença tem sido registrada em 12 países da América Latina, observando-se que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, constituindo um grave problema de saúde pública. Neste cenário, a imunoprofilaxia surge como uma das alternativas mais importantes para o controle da leishmaniose visceral considerando que até o momento ainda não existe uma vacina que seja indicada pelo Ministério da Saúde/Brasil para atuar no controle desta doença. Buscando a triagem racional de candidatos vacinais anti-*Leishmania*, torna-se fundamental a escolha de um modelo experimental que possa mimetizar a infecção humana e canina. Neste sentido, o hamster dourado apresenta-se altamente susceptível à infecção por *Leishmania*, apresentando alterações clínico-patológicas semelhantes as doenças humana e canina, tornando-o um excelente modelo para a realização de ensaios pré-clínicos vacinais anti-*Leishmania*. Destaca-se ainda que nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem concentrado esforços no desenvolvimento e análise de candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina utilizando antígenos heterólogos de espécies dermatotrópicas de *Leishmania*. Nesse sentido, recentemente uma das formulações vacinais desenvolvidas contra a leishmaniose visceral canina foi transferida para empresa Ourofino Saúde Animal. Assim, o presente estudo buscou o desenvolvimento de uma nova vacina utilizando nanopartículas para favorecer o endereçamento antigênico às células apresentadoras de antígeno e, conseqüentemente, permitir o estabelecimento de uma reposta imune protetora contra a leishmaniose visceral. Diante do exposto, este estudo apresenta como hipótese geral que o uso de partículas submicrométricas de polímero biodegradável de ácido poli-*D,L*-lático (PLA) carregado com antígenos de *Leishmania amazonensis* permitirá a vetorização do antígeno vacinal para as células apresentadoras de antígenos, favorecendo o estabelecimento de uma resposta imune compatível com o controle da leishmaniose visceral.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Realizar um ensaio pré-clínico vacinal em hamsters para analisar a imunogenicidade de uma nanoformulação contra a leishmaniose visceral.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar em hamster vacinados com antígenos de *L. amazonensis* encapsulado em partículas submicrométricas e desafiados com *L. chagasi*, os seguintes aspectos:

- 4.2.1. Avaliação de inocuidade, toxicidade e alterações locais pré-vacinais.
- 4.2.2. Avaliação dos aspectos clínicos, da sobrevivência e da massa corporal.
- 4.2.3. Análise da função hepática e renal.
- 4.2.4. Caracterização de parâmetros hematológicos.
- 4.2.5. Estudo da resposta imune humoral anti-*Leishmania*.
- 4.2.6. Análise da carga parasitária tecidual.

5. Animais, Materiais e Métodos

5.1 Animais

Foram utilizados 64 hamster sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, com aproximadamente 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério de Produção do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz – MG. Estes animais foram mantidos em racks ventiladas, instaladas em sala climatizada e controle claro/escuro de 12h. Este espaço consiste no Biotério de Ensaio Pré-Clínicos, do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia - Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais passaram por um período de quarentena, assim que chegaram ao Biotério de Ensaio Pré-Clínicos, permanecendo em sala separada, onde foi fornecido ivermectina (0,2mg/kg, 100ul/animal) por via subcutânea. Após 10 dias os animais foram encaminhados à sala de experimentação para início dos experimentos. Durante todo o período do ensaio foi fornecido água (coletada no biotério e submetida a um sistema de dupla filtração e remoção do cloro) e ração (Nuvilab[®], São Paulo, Brasil) à vontade. É importante ressaltar que o projeto referente a esta pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), através do protocolo n° 385 / 2013 (Anexo 1).

5.2 Obtenção e produção dos candidatos vacinais

5.2.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante

Todo o antígeno vacinal utilizado neste estudo foi produzido a partir de mesma partida de cultura, conforme descrito por GIUNCHETTI *et al.* (2007), com modificações. A cultura de promastigotas empregou a cepa de *Leishmania amazonensis* (PH8), cultivada em meio de cultura *Minimum Essential Medium – Alpha Medium* (GIBCO) suplementado com Soro Fetal Bovino (CULTILAB), penicilina (SIGMA), HEPES (SIGMA). A cultura axênica foi expandida a partir de um inóculo inicial de 10mL de meio alfa-mem contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL de *L. amazonensis* em crescimento logarítmico, sendo realizados repiques a cada três dias de cultivo, correspondendo à fase logarítmica de crescimento do parasito, em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil) e em garrafas de cultura de 250mL (Pyrex Corning, EUA), que foram mantidas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM[®] modelo

347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A cultura foi mantida por no máximo 8 repiques, sob condições estéreis, sendo homogeneizadas diariamente.

Após 5 dias do último repique, com a cultura em fase estacionária, contendo cerca de 10^7 a 10^8 promastigotas/mL, foi iniciada a etapa de lavagem, procedendo-se a remoção da cultura em capela de fluxo laminar seguida pela transferência para tubos estéreis de polipropileno de 50mL (Falcon[®], Becton Dickinson, EUA). Estes tubos foram submetidos à centrifugação a $1540 \times g$ durante 15 minutos a 4°C , e após descartar-se o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, foi realizada a centrifugação nas mesmas condições. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes.

Uma vez obtida a massa de promastigotas, o antígeno bruto foi obtido pelo rompimento do parasito em ultrassom (Sonifier Cell Disruptor[®] - Branson Sonic Power Co. – EUA), por um minuto a 40 Watts em banho de gelo. O antígeno foi alíquotado, sendo a concentração proteica dosada pelo método de LOWRY *et al.* (1951) e congelado a -70°C (Forma Scientific, EUA), até o momento do uso como antígeno bruto ($4000\mu\text{g}$ de proteína/mL), ou para ser submetido a nanoformulação, conforme descrito nos grupos experimentais deste estudo.

Para obtenção da solução adjuvante, cada dose foi preparada para conter $100\mu\text{g}$ de saponina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. USA) diluída em solução salina estéril 0,85% no momento do inóculo.

5.2.2 Obtenção da nanoformulação vacinal

As partículas submicrométricas (PSm) foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido de evaporação do solvente (FESSI *et al.*, 1989). Desta forma, foram preparadas PSm brancas (sem antígeno) e PSm contendo 1mg/mL do antígeno de *L. amazonensis*, utilizando, para tal, o polímero ácido poli-*D,L*-lático (PLA); peso molecular 75000-120000 g/mol (Sigma) e, quitosana de baixo peso molecular (Sigma). Os antígenos foram homogeneizados durante 1min em banho de gelo utilizando um sonificador (Vibra Cell[™] VCX750). O processo de preparo das PSm consiste da mistura de uma fase orgânica miscível em água em uma fase aquosa. A fase orgânica foi constituída do PLA nas concentrações de 5mg/mL e 50mg/mL ,

dissolvido em acetona. Essa solução orgânica foi vertida com uma seringa em uma solução aquosa contendo o antígeno e a quitosana (previamente solubilizada em ácido acético 0,05M; Sigma), também nas concentrações de 5 mg/mL e 50 mg/mL, e mantido por agitação por 10 minutos, seguido da evaporação do solvente a pressão reduzida como apresentado pela Tabela 1.

Tabela 1 - Preparação das partículas submicrométricas (PSm) com as diferentes concentrações utilizadas.

Form.*	PLA (mg/mL)	Quitosana (mg/mL)	Antígeno (1 mg/mL)	Acetona (ml)	Água (ml)	Tamanho (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
FA	5	5	-	6	11	350,6 ± 15,3	0,159	+66,6 ± 4,3
FB	50	50	-	14	8	613,4 ± 16,8	0,133	+66,8 ± 4,4
FC	5	5	<i>L. amazonensis</i>	6	10	409,8 ± 11,7	0,157	+42,2 ± 5,8
FD	50	50	<i>L. amazonensis</i>	14	7	652,7 ± 12,3	0,153	+56,3 ± 4,3

IP = índice de polidispersão; * diferentes formulações (FA, FB, FC e FD) em volume final de 1mL; PLA = ácido poli-*D,L*-lático; Formula "A", "B", "C", "D".

Todo o procedimento de nanoformulação foi realizado pelo Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (EFAR-UFOP).

5.3 Delineamento e protocolo experimental

Para a realização dos testes de imunogenicidade e de proteção vacinal, os hamsters foram distribuídos em 8 grupos experimentais, e um grupo Pré-imune, com 8 animais cada, entre os quais:

Grupo Pré-imune ($n=8$) – os animais foram escolhidos aleatoriamente, um de cada grupo de animais, para se ter um perfil inicial, representativo de todos os grupos, de parâmetros da função hepática, renal, hematologia, leucograma e sorologia anti-*Leishmania* no tempo inicial.

- (i) **Grupo Controle (C)** – os animais receberam uma aplicação de 200 μ L de solução salina estéril a 0,85%, por via subcutânea.
- (ii) **Grupo Saponina (SAP)** – os animais receberam aplicação de 200 μ L de solução de saponina, por via subcutânea.

- (iii) **Grupo Partícula Submicrométrica Pequena vazia (PSmP)** - Os animais receberam a aplicação de 200µL, contendo 68,96µL de partícula submicrométrica pequena sem antígeno e 131µL de solução salina estéril à 0,85%, por via subcutânea.
- (iv) **Grupo Partícula Submicrométrica Grande vazia (PSmG)** - os animais receberam a aplicação de 200µL, contendo 68,96µL de partícula submicrométrica grande sem antígeno e 131µL de solução salina estéril à 0,85%, por via subcutânea.
- (v) **Grupo Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA)** - os animais receberam a aplicação de 200µL de solução salina estéril à 0,85%, contendo uma concentração antigênica de 13,39µL de antígeno bruto de *L. amazonensis* por via subcutânea.
- (vi) **Grupo Antígeno bruto *L. amazonensis* mais Saponina (LASAP)** - os animais receberam a aplicação de 200µL, contendo uma concentração antigênica de 13,39µL de antígeno bruto de *L. amazonensis* e 186,61µL de solução de saponina (100 µg/dose), por via subcutânea.
- (vii) **Grupo Partícula Submicrométrica Pequena + *L. amazonensis* (LAPSmP)** - os animais receberam aplicação de 200µL, contendo 68,96µL de partícula submicrométrica pequena e 13,39µL de antígeno bruto de *L. amazonensis* associado a 117,65µL de solução salina à 0,85%, por via subcutânea.
- (viii) **Grupo Partícula Submicrométrica Grande + *L. amazonensis* (LAPSmG)** - os animais receberam a aplicação de 200µL, contendo 68,96µL de partícula submicrométrica grande e 13,39µL de antígeno bruto de *L. amazonensis* associado a 117,65µL de solução salina 0,85%, por via subcutânea.

Três doses subcutâneas, dos respectivos candidatos vacinais, foram administradas (200µL/hamster/dose) utilizando agulha hipodérmica curta (26G / ½). Vale ressaltar que o intervalo entre cada dose foi de 21 dias. O desafio experimental foi realizado com 10⁷ promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* (cepa C46) após 51 dias da última dose. Nos tempos T0 (Antes da 1º dose), T3 (30 dias após a terceira dose) e T180 (180 dias após desafio experimental com *L. chagasi*, e imediatamente antes da eutanásia), foram feitas coletas de sangue dos animais por punção cardíaca para realização

de teste de função hepática e renal, hemograma e análise dos níveis de IgG anti-*Leishmania*.

Após a eutanásia dos animais, foram coletados baço e fígado para análise da carga parasitária pela técnica de diluição limitante.

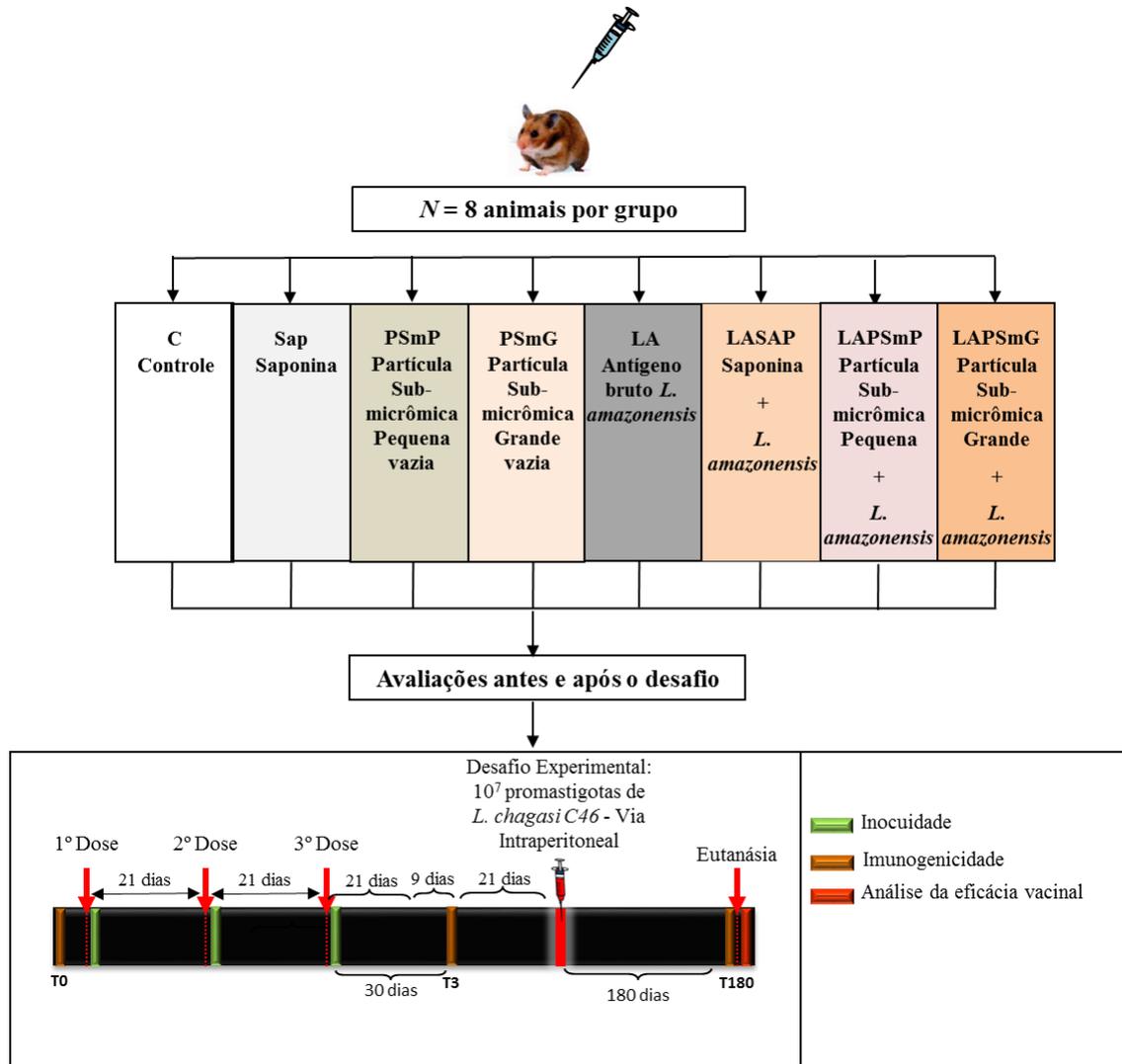


Figura 1 - Esquema do desenho experimental para avaliação dos hamsters submetidos a diferentes protocolos vacinais. T0 = Pré-Imune (coleta de soro antes da primeira imunização); T3 (30 dias após a terceira dose); T180 (180 dias após o desafio experimental com *L. chagasi*).

5.4 Desafio experimental

O desafio experimental foi realizado com promastigotas de *L. chagasi* (cepa C46), mantidas em meio Minimum Essential Medium – Alpha Medium (GIBCO)

suplementado com Soro Fetal Bovino (CULTILAB), penicilina (SIGMA), HEPES (SIGMA), em Erlenmeyers, e armazenadas em estufa biológica refrigerada BOD (FADEM[®] modelo 347), à temperatura de 23°C±1°C. A cultura foi expandida e submetida a repiques para produção do parasito, nas mesmas condições descritas no item 5.2.1 *Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante*. Desta forma, a cultura foi removida na fase estacionária, para tubos Falcon[®] de 50mL, e submetidos a centrifugação a 1540 xg por 10 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e, em seguida, realizada mais uma centrifugação. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Posteriormente, as promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e o volume final ajustado para que cada 100µL de solução salina estéril a 0,9% apresentasse 10⁷ parasitos. Os parasitos, foram inoculados por via intraperitoneal, em todos os animais, com o auxílio de agulha hipodérmica curta (26G).

5.5 Avaliação dos aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade

O local do inóculo e o comportamento dos animais foi observado nos dias das imunizações e nos três dias subsequentes. Neste contexto, foi realizada uma observação criteriosa do local do inóculo, no qual o intuito foi avaliar macroscopicamente a presença de nódulos, pápulas ou lesões ulcerativas. Para avaliar possíveis alterações comportamentais observou-se a presença de sinais de dor local, alterações neurológicas e agressividade, eriçamento de pelos e apatia.

5.5.1 Análise dos aspectos clínicos, da sobrevivência e da massa corporal

Durante o período experimental, os animais foram acompanhados semanalmente por um período de 273 dias, que compreende o período durante as imunizações até a eutanásia (180 dias após o desafio com *L. chagasi*). Os animais passaram por inspeção clínica, além de se avaliar a sobrevivência e o peso corporal para isso foi utilizada uma balança analítica. No dia da eutanásia, foi realizado um exame clínico minucioso, com destaque para alterações como desidratação, astenia, caquexia, alterações dermatológicas (brilho da pelagem, alopecia, presença de nódulos, úlceras), alterações viscerais e da cavidade abdominal (esplenomegalia, hepatomegalia, ascite).

5.6. Análise da função hepática e renal

A dosagem de enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram utilizadas para o estudo da função hepática, enquanto que os níveis de ureia e creatinina, para análise da função renal. Deste modo, 700 µL de sangue foram colhidos por punção cardíaca e acondicionados em tubos com heparina. As análises bioquímicas foram realizadas a partir do plasma obtido após a centrifugação do sangue heparinizado em Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus. Utilizou-se kits comerciais da Kovalent, incluindo os analitos creatinina pelo método cinético, ureia pelo método UV enzimático, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), ambos, pelo método UV otimizado, de acordo com IFCC (Federação internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial).

Desta maneira, foram obtidos e analisados os dados de atividade inflamatória e toxicidade das nanopartículas. Os valores de referência utilizados estão descritos na Tabela abaixo:

Tabela 2 - Valores de referência de bioquímica sérica de hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), linhagem BIO15.16, idade entre 12 e 18 meses. Resultados expressos em (mg/dL) e (IU/L), para machos e fêmeas.

	Machos		Fêmeas	
	Ureia (mg/dL)	16	24	16
Creatinina (mg/dL)	0,3	0,5	0,3	0,6
Aspartato Aminotransferase - AST (IU/L)	25	51	22	42
Alanina Aminotransferase - ALT (IU/L)	24	48	19	43

Fonte: Wolford *et al.* (1986)

5.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos dos hamsters foi feita em três diferentes tempos. Nos tempos T0 (imediatamente antes da primeira dose), T3 (após 30 dias do terceiro inóculo) e T180 (180 dias após o desafio experimental e imediatamente antes da eutanásia).

Para cumprir com este objetivo, o sangue de cada um dos animais, de acordo com o grupo experimental, foi coletado por punção cardíaca 700µl e adicionado a um microtubo de 1,5mL contendo 10µL do anticoagulante heparina (5,000 UI/ml). O

hemograma foi realizado em Analisador Hematológico Veterinário 2800 Vet (Mindray®, China), pelo método de impedância que fornece a contagem automática de leucócitos totais, hemácias, plaquetas, concentração de hemoglobina, dentre outros. O volume globular foi avaliado, também, pelo método de micro-hematócrito, que consiste na coleta do sangue em tubo microcapilar e na centrifugação por cinco minutos a 15,000 xg. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir da contagem de 100 células por análise citomorfológica realizada em microscopia óptica, em objetiva de 20X, 40X e 100X, utilizando esfregaços sanguíneos corados por Giemsa. Os valores obtidos foram comparados com os valores de referência, descritos por WOLFORD *et al.* (1986), e apresentados a seguir:

Tabela 3 - Valores de referência de hematologia do hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), linhagem BIO15.16, idade entre 12 e 18 meses. Resultados expressos em valores absolutos e percentuais, para machos e fêmeas.

	Machos		Fêmeas	
Hematócrito (%)	36,2	43,8	35,5	44,0
Hemoglobina (g/dL)	12,3	16,5	13,6	16,0
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6,0	8,0	6,4	7,8
Reticulócitos (%)	0,2	3,0	0,6	3,6
Volume Corpuscular Médio (VCM) (μm^3)	53,9	56,3	54,4	59,4
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg)	20,1	21,5	20,4	22,1
Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (%)	36,4	39,2	35,9	39,0
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	697	968	723	1101
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	5500	9200	6700	11300
Neutrófilos (%)	1100	4968	1876	7232
Eosinófilos (%)	0,0	276	0,0	339
Basófilos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Linfócitos (%)	2200	7084	2010	7797
Monócitos (%)	0,0	368	0,0	452

Fonte: Wolford *et al.* (1986).

5.8 Avaliação do perfil humoral

5.8.1 Análise dos níveis de IgG total anti-*Leishmania*

Os diferentes grupos experimentais foram avaliados quanto à presença de anticorpos contra *L. chagasi* através do ensaio de ELISA, nos tempos T0, T3 e T180. O ensaio de ELISA indireto para hamsters seguiu a metodologia descrita por MOREIRA *et al.* (2012). Amostras de soro de hamsters comprovadamente negativos e positivos para infecção por *L. chagasi*, foram utilizados como controles negativo e positivo da reação, respectivamente. Microplacas de poliestireno (Perkin Elmer Spectra Plate™ - TC 96, Waltham, EUA) foram sensibilizadas com antígeno bruto de *L. chagasi*, na concentração de 1µg/mL por *well*, em solução de tampão carbonato-bicarbonato a 0,05M, pH 9,6. Após 12 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com PBS1x a 0,05% de *Tween* 20 (PBS-T), pH 7.4. O bloqueio foi feito com 200µL/poço de PBS1x, contendo 3% de BSA (Albumina de Soro bovino), por 2h à temperatura ambiente (24° C), seguido de quatro lavagens com PBS-T.

Em seguida, foram adicionadas as amostras de soros no volume de 100µL/poço diluídos 1:100 em PBS-T. Após 12 horas de incubação à 4°C, as placas foram lavadas com PBS-T e, em seguida, adicionados 100 µL/poço de imunoglobulina de cabra anti-IgG de hamster conjugada à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluída a 1:5000 em PBS-T. Após incubação por 2h, à temperatura ambiente, foram feitas quatro lavagens com PBS-T.

A revelação da reação foi feita com 100 µL/poço de solução contendo peróxido de hidrogênio a 0,03% e orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma, USA) em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico - C₆H₈O₇ a 0.1 M; fosfato de sódio - NaH₂PO₄ a 0.2 M) pH 5,1, em ambiente escuro, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 30µL de ácido sulfúrico por poço e a placa lida imediatamente em espectrofotômetro com filtro de 490nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata. Os resultados de IgG total estão representados pela média dos valores de densidade óptica (DO) ± dois desvios padrão de amostras de soro dos controles não infectados de hamsters.

5.9 Quantificação da carga parasitária no baço e no fígado

A carga parasitária foi avaliada por meio da técnica de diluição limitante, conforme descrito por TITUS *et al.* (1985). No tempo T180 fragmentos obtidos do baço e do fígado foram macerados individualmente utilizando-se macerador manual estéril e as suspensões obtidas do baço e do fígado foram centrifugadas (616 xg por 10 minutos a 4°C) e ressuspensas em 500µL de meio Minimum Essential Medium – Alpha Medium (GIBCO) suplementado com Soro Fetal Bovino (CULTILAB), penicilina (SIGMA), HEPES (SIGMA). Em placas de 96 poços foram realizadas a diluição limitante de cada uma das amostras dos animais de cada grupo, em duplicata. Nos dois primeiros poços, foram adicionados 200µL da suspensão de baço ou de fígado; nos poços restantes foram adicionados 160µL de meio Alpha Medium. A diluição limitante seguiu retirando-se 40 µL da suspensão de baço ou de fígado do primeiro poço, e adicionando ao segundo, e assim sucessivamente, até o último poço da placa, sendo que a cada poço a diluição foi de 1:5. As ponteiros foram trocadas a cada diluição. Ao término, as placas foram vedadas com parafilme e acondicionadas em estufa biológica refrigerada BOD (FADEM® modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C.

Para quantificação dos parasitos, foi avaliada a presença dos mesmos no sétimo dia de cultivo, foi feita a contagem em câmara de Neubauer do número de parasitos na duplicata de poços. A média do número de parasitos presentes na duplicata, foi multiplicada pelo fator de diluição do poço correspondente, e o valor encontrado corresponde a quantidade de parasitos presente no fragmento de órgão macerado. A partir do valor encontrado para o fragmento, pode-se calcular a quantidade de parasito correspondente ao órgão inteiro, seguindo a seguinte relação:

$$\text{Número de parasitos no órgão} = \frac{\text{Número de parasitos no fragmento} \times \text{peso do órgão inteiro}}{\text{Peso do fragmento do órgão}}$$

O resultado da carga parasitária foi expresso no gráfico (11A e 11B): Grupo experimental / carga parasitária.

5.10 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* Graph Pad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste “Kolmogorov-Smirnoff”. Os testes de análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de comparações múltiplas de “Tukey” foram empregados para avaliação entre os grupos vacinais (aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade, análise de sinais clínicos, análise da função hepática e renal, avaliação dos parâmetros hematológicos, quantificação de IgG total, avaliação da carga parasitária). Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6. Resultados

6.1 Avaliação de inocuidade e toxicidade vacinal

A avaliação das alterações no local do inóculo evidenciaram alterações em hamster inoculados com PSmG vazia e associado com antígeno de *L. amazonensis* (PSmG, LAPSmG). Foi observada a presença de nódulos não ulcerados, de consistência firme, em dois animais do grupo PSmG, com dimensões de 3mm x 4mm. Além disto, observou-se em um animal do grupo LAPSmG a presença de nódulos com dimensões de 3mm x 3mm acompanhados de ulcerações. O grupo controle não apresentou alterações no local do inóculo, conforme pode ser observado na Figura 2.

As observações clínicas e comportamentais realizadas após a administração de cada dose vacinal evidenciou que não houveram alterações toxicológicas nos grupos decorrentes do inóculo, tais como: astenia, alopecia, caquexia, desidratação, alteração no brilho da pelagem. Cabe destacar que um único animal do grupo LAPSmG apresentou paralisia do lado esquerdo do corpo, este animal foi eutanasiado.

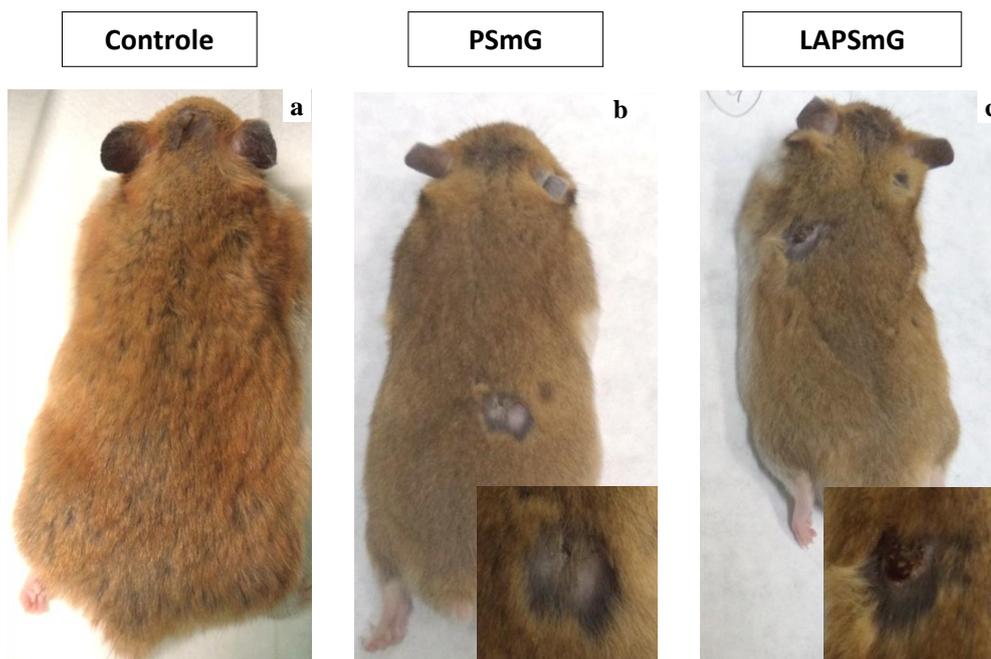


Figura 2 - Alterações dermatológicas nos animais dos grupos experimentais: Controle (a); Partícula Submicrométrica Grande (b); e Partícula Submicrométrica Grande associada ao antígeno bruto de *L. amazonensis* (c).

6.2 Aspectos clínicos e sobrevivência dos animais após o desafio por *L. chagasi*

Em todos os grupos avaliados, o percentual de mortalidade apresentou variação, sendo registrado ausência de mortalidade nos grupos PSmP e PSmG, e um maior percentual de

mortalidade nos grupos SAP, LA e LAPSmG (25%), conforme pode ser observado na Tabela 4.

Por meio da avaliação dos parâmetros clínicos após o desafio experimental com *L. chagasi* até o T180 foi possível observar, em animais de grupos distintos, a presença de alopecia dorsal, alopecia da face, nódulos não ulcerativos, caquexia, ascite, pelagem opaca, caquexia, congestão, bem como hepatomegalia e esplenomegalia. Todas as alterações clínicas apresentadas pelos animais, de cada um dos grupos experimentais, estão ilustradas na Tabela 4 e na Figura 3. Conforme mostrado na Tabela 4, a análise estatística mostrou que os animais do grupo LAPSmP apresentaram menos ($p=0,0392$) alopecia dorsal quando comparados ao grupo controle. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da frequência de alterações clínicas e da mortalidade, observadas em hamsters dourados, dos diferentes grupos experimentais, até a data da eutanásia.

Grupos	Mortalidade	Alopecia dorsal	Alopecia na face	Nódulos não ulcerativos	Caquexia	Ascite	Pelo opaco	Congestão hepática	Congestão esplênica	Esplenomegalia	Hepatomegalia
Controle	1/8 (10%)	6/7 (85,7%)	1/7 (14,2%)	1/7 (14,2%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	3/7 (42,8%)	0/7 (0%)	2/7 (28,5%)	1/7 (14,2%)	0/7 (0%)
SAP	2/8 (25%)	5/6 (83,3%)	1/6 (16,6%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	4/6 (66,6%)	0/6 (0%)	1/6 (16,6%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
PSmP	0/8 (0%)	5/8 (62,5%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)	0/8 (0%)
PSmG	0/8 (0%)	5/8 (62,5%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)	1/8 (12,5%)	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)	0/8 (0%)
LA	2/8 (25%)	5/6 (83,3%)	0/6 (0%)	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)	0/6 (0%)	2/6 (33,3%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
LASAP	1/8 (10%)	5/7 (71,4%)	1/7 (14,2%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14,2%)	1/7 (14,2%)	1/7 (14,2%)	0/7 (0%)	1/7 (14,2%)	1/7 (14,2%)
LAPSmP	1/8 (10%)	*2/7(28,5%)	3/7 (42,8%)	1/7 (14,2%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	2/7 (28,5%)	0/7 (0%)
LAPSmG	2/8 (25%)	5/6 (83,3%)	2/6 (33,3%)	2/6 (33,3%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)

* Diferença estatística observada entre os grupos controle e LAPSmP ($p < 0,05$). As análises foram realizadas comparando-se cada um dos sinais clínicos presentes nos grupos. Os dados estão apresentados em valores absolutos e percentuais (%).

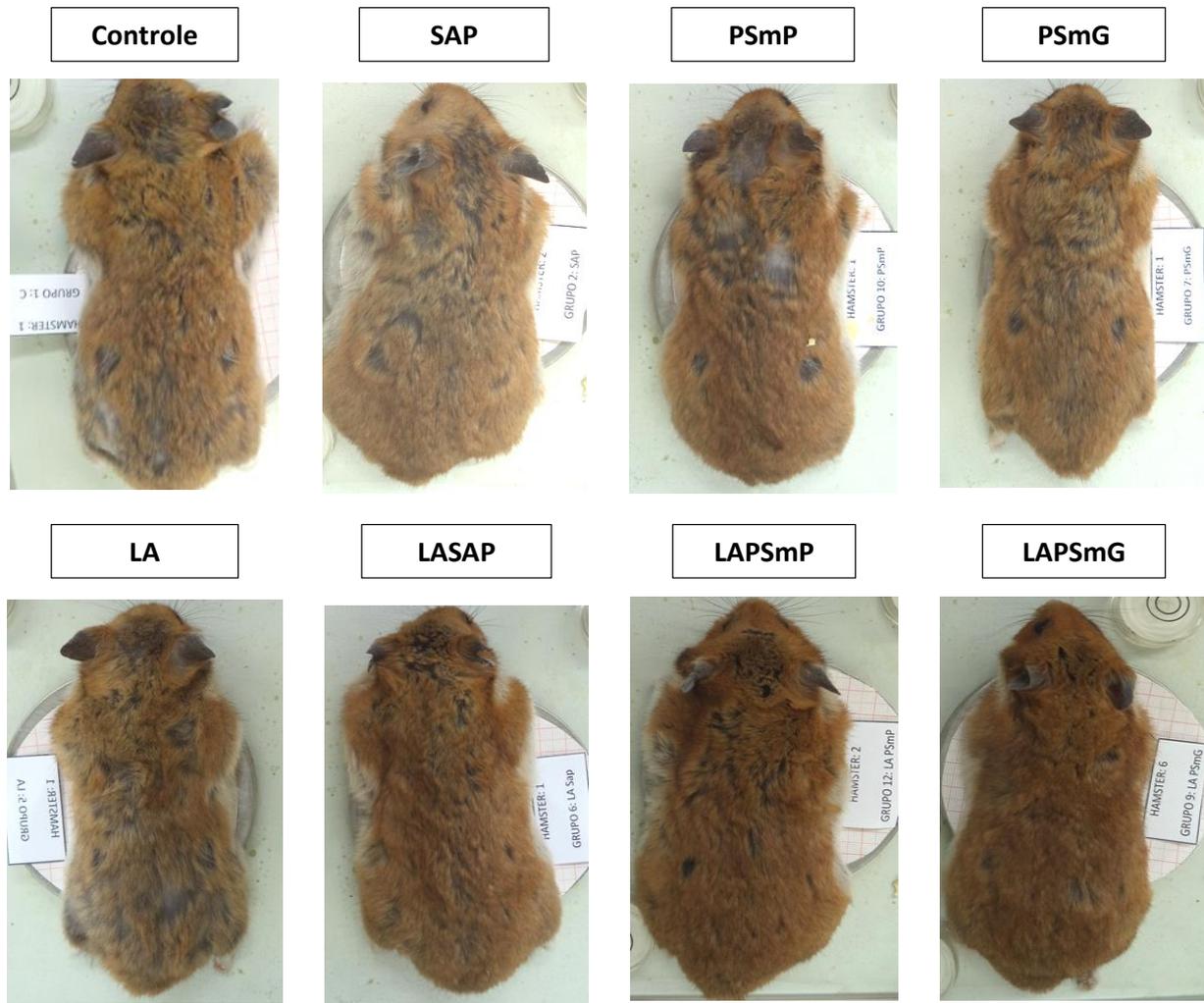


Figura 3 - Alterações macroscópicas observadas na região dorsal de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais, entre os quais: Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associado a *L. amazonensis* (LAPSmp); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG).

6.3 Avaliação da massa corporal

A massa corporal dos animais dos diferentes grupos avaliados foi analisada de forma comparativa nos tempos T3 e T180 (Figura 4). Na Figura 4A é possível observar que os grupos LA (160.16 ± 9.19) e LAPSmG (156 ± 5.32) avaliados, no T180, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de peso quando comparado ao T3 (142.25 ± 8.43 ; 136.83 ± 3.86) demonstrando que os hamsters não deixaram de ganhar peso nestes grupos experimentais.

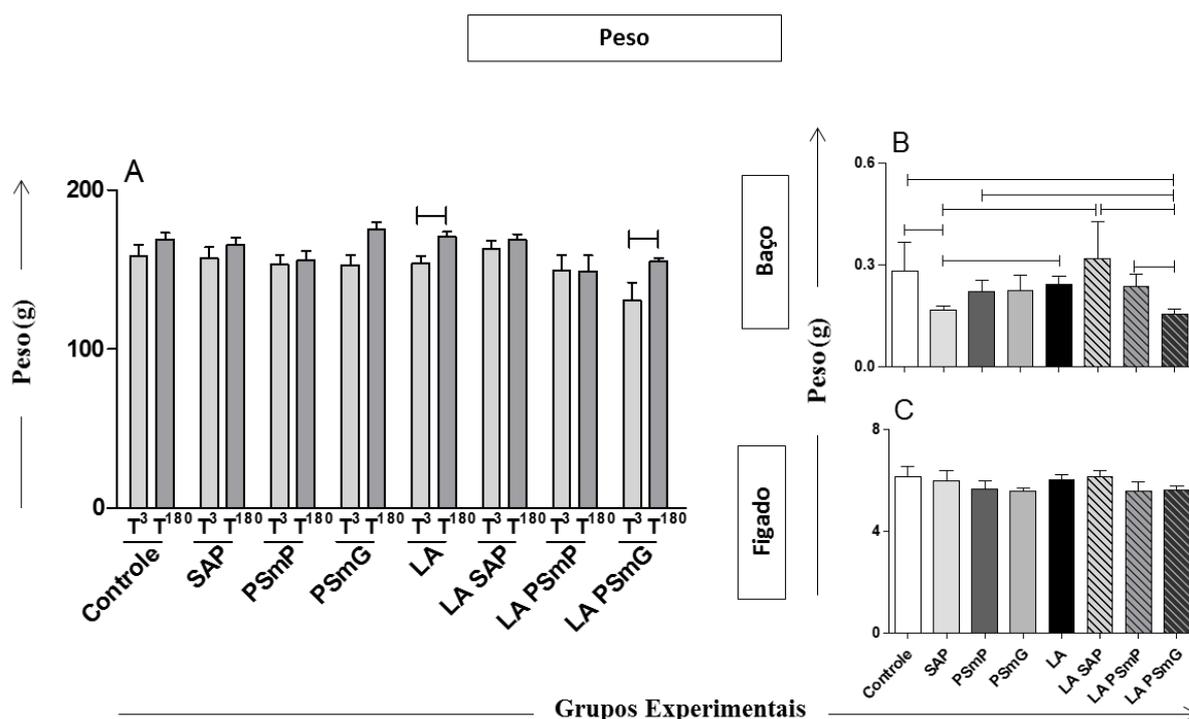


Figura 4 - Avaliação da massa corporal de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais, entre os quais: Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associada a *L. amazonensis* (LAPSmP); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Em (A) estão ilustrados os valores do peso (média±desvio padrão) para cada grupo avaliado, nos tempos T3 e T180. Os pesos do baço (B) e fígado (C) foram mensurados imediatamente após a eutanásia (T180), e estão representados como média±desvio padrão. As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p<0,05$).

Na Figura 4B é possível observar que, após a eutanásia (T180), houve redução ($p<0,05$) no peso do baço dos animais do grupo SAP (0.166 ± 0.02) em relação aos grupos Controle (0.281 ± 0.31), LA (0.243 ± 0.05), LASAP (0.317 ± 0.29) (Figura 4B). Cabe destacar ainda que houve uma grande redução ($p<0,05$) no peso do baço do grupo LAPSmG (0.155 ± 0.03) em relação aos grupos Controle, SAP (0.166 ± 0.02), PSmP (0.219 ± 0.10), LASAP e LAPSmP (0.235 ± 0.031). A análise estatística do peso do fígado (Figura 4C) não mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos avaliados. Isto evidencia que todos os grupos apresentaram hepatomegalia, uma vez que o grupo controle, uma vez avaliado após o desafio experimental, apresentou aumento do fígado, característica associada a leishmaniose visceral. A Figura 5 ilustra o aspecto macroscópico associados ao baço e ao fígado, em cada um dos grupos avaliados do presente estudo apresentando-se mais esplenomegalia no grupo LASAP (k, l) em relação ao grupo Controle (a, b) observando-se órgão congesto, áreas de infarto e a cápsula espessada e mostram áreas de inflamação.

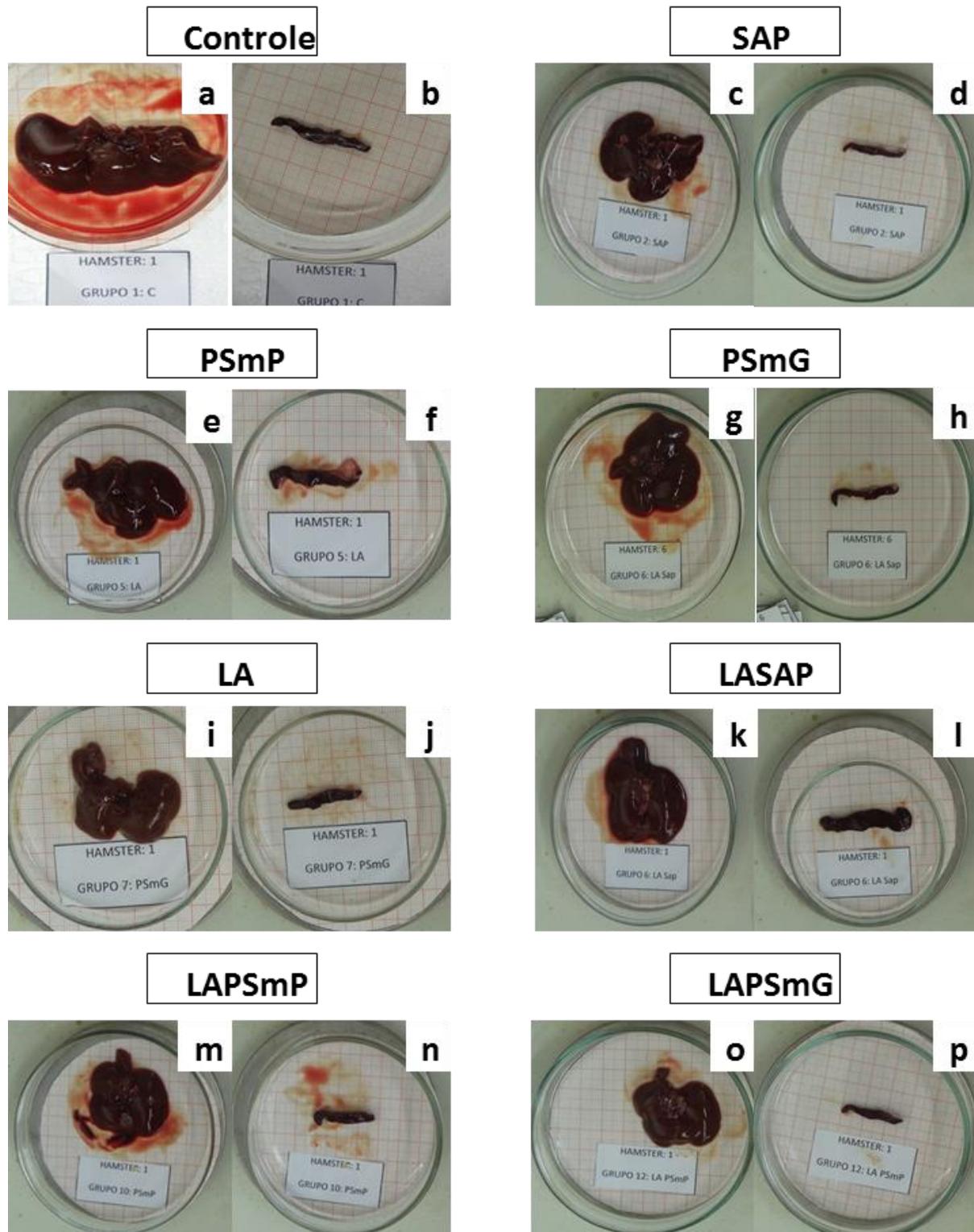


Figura 5 - Alterações macroscópicas no fígado e no baço de hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais, entre os quais: Controle (a, b); Saponina (SAP; c, d); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP; e, f); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG; g, h); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA; i, j); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP; k, l); Partícula Submicrométrica Pequena associado a *L. amazonensis* (LAPSmP; m, n); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG; o, p).

6.4. Análise bioquímica - função hepática

As avaliações da função hepática (Figura 6) e renal (Figura 7) foram realizadas para verificar uma possível alteração sistêmica, induzida pelas diferentes formulações avaliadas, como pré-requisito dos testes de inocuidade e toxicidade.

A partir dos valores obtidos na dosagem de ALT, observou-se aumento ($p < 0,05$) no tempo T3 para os grupos SAP (50.58 ± 14.52) e LA (48.43 ± 14.79) em relação ao grupo LASAP (40.66 ± 26.23) (Figura 6). Adicionalmente, o grupo LAPSmP, apresentou aumento dos níveis de ALT ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos PSmG (35.95 ± 13.94), LASAP (40.66 ± 26.23) e LAPSmG (36.24 ± 15.49) (Figura 6).

Em T180, houve aumento dos níveis de ALT nos grupos PSmP (105.01 ± 69.41), PSmG (88.60 ± 26.58), LASAP (85.23 ± 41.96), e LAPSmP (77.08 ± 14.75) em relação ao grupo LAPSmG (59.65 ± 21.02) (Figura 6).

A análise dos níveis de AST, em T3, revelou aumento ($p < 0,05$) dos grupos Pré-imune (122.58 ± 53.88) e LAPSmP (106.38 ± 42.85) em relação ao grupo LASAP (56.47 ± 18.09), além de ter sido observado aumento no grupo LAPSmP (106.38 ± 42.85) em relação ao grupo Controle (62.08 ± 36.60) (Figura 6). No tempo 180, os níveis de AST ficaram dentro dos limites de normalidade para hamster nos diferentes grupos avaliados (Figura 6).

Fica claro nos gráficos que alguns grupos apresentaram variação nos níveis de ALT e AST, fora dos limites de normalidade. Deste modo, como a alteração hepática poderia ser definida pelo aumento simultâneo das enzimas ALT e AST, no tempo T3, em uma análise preliminar, os seguintes grupos apresentaram esta alteração: Pré-imune, Controle, SAP, PSmP, LA e LAPSmP. Seguindo este critério, não é possível constatar alteração da função hepática no período após o desafio (T180) para os diferentes grupos experimentais avaliados.

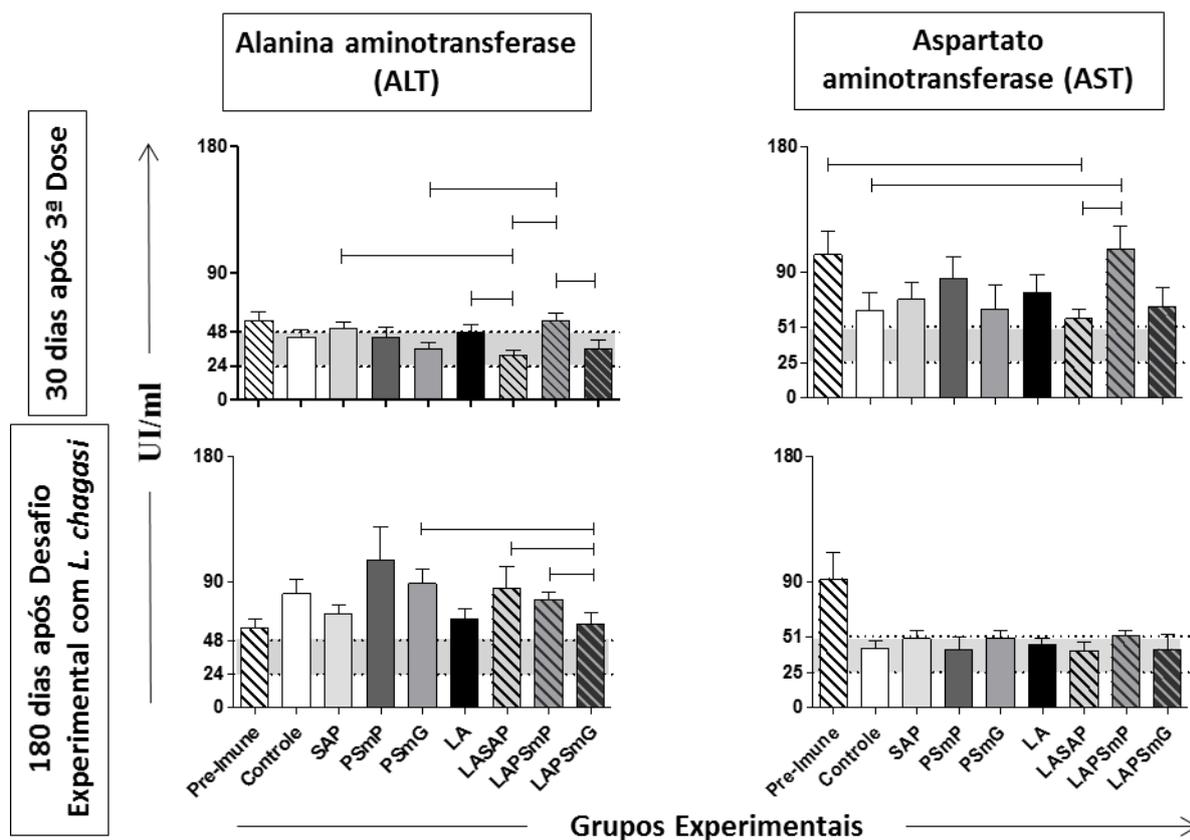


Figura 6 - Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em hamsters dourados, após 30 dias da terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180), considerando os diferentes grupos experimentais estão representados pelas siglas Pré-imune, Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associado a *L. amazonensis* (LAPSmP); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Os gráficos ilustram a quantidade das enzimas ALT e AST (UI/mL), pelos valores da média±desvio padrão, nos tempos T3 e T180. As linhas tracejadas, no intervalo contido pelo retângulo cinza de cada gráfico, representam os valores máximos e mínimos considerados normais em hamsters, conforme descrito por Wolford *et al.*, (1986). As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p < 0,05$).

6.5. Análise bioquímica - função renal

As concentrações de ureia e creatinina foram mensuradas como forma de avaliar a função renal (Figura 7). A partir dos valores obtidos na avaliação da ureia em T3, foi possível demonstrar aumento ($p < 0,05$) no grupo Pré-imune (60.81 ± 27.05) em relação aos grupos PSmG (39.9 ± 7.08) e LASAP (40.84 ± 4.23) (Figura 7). Além disto, em T3, também foi observado aumento ($p < 0,05$) dos níveis de ureia no grupo Controle (49.70 ± 3.52) em relação aos grupos PSmG (39.9 ± 7.08) e LASAP (40.84 ± 4.23), bem como aumento no grupo SAP (48.15 ± 6.90) em relação aos grupos PSmG (39.9 ± 7.08) e LASAP (40.84 ± 4.23). Foi observado ainda aumento dos níveis de ureia, em T3, no grupo PSmP (56.72 ± 21.81) em relação ao grupo

LASAP (40.84 ± 4.23). Ainda em T3, houve aumento ($p < 0,05$) dos níveis de ureia no grupo LAPSmP (51.59 ± 8.25) em relação aos grupos PSmG (39.9 ± 7.08) e LASAP (40.84 ± 4.23), bem como aumento nos grupos LAPSmG (48.23 ± 5.06) em relação aos grupos PSmG (39.9 ± 7.08) e LASAP (40.84 ± 4.23). Após o desafio experimental (T180) foi observado aumento ($p < 0,05$) dos níveis de ureia no grupo pré-imune (60.81 ± 27.05) em relação aos grupos Controle (41.27 ± 7.69), SAP (36.61 ± 6.55), PSmP (38.36 ± 2.98), LA (35.71 ± 2.48) e LAPSmG (39.25 ± 3.81) (Figura 7).

A análise dos níveis de creatinina, em T3 apresentou aumento ($p < 0,05$) no grupo LAPSmG (0.31 ± 0.08), em relação ao grupo Pré-imune (0.27 ± 0.10) (Figura 7); assim como também em T180, apresentou aumento ($p < 0,05$) no grupo LAPSmG (0.34 ± 0.067), em relação ao grupo Pré-imune (0.27 ± 0.10) (Figura 7).

Considerando que a disfunção renal é caracterizada pela elevação, tanto dos níveis de ureia, como de creatinina, a análise realizada no tempo T3 e T180, não indicou alteração da função renal nos diferentes grupos experimentais avaliados (Figura 7).

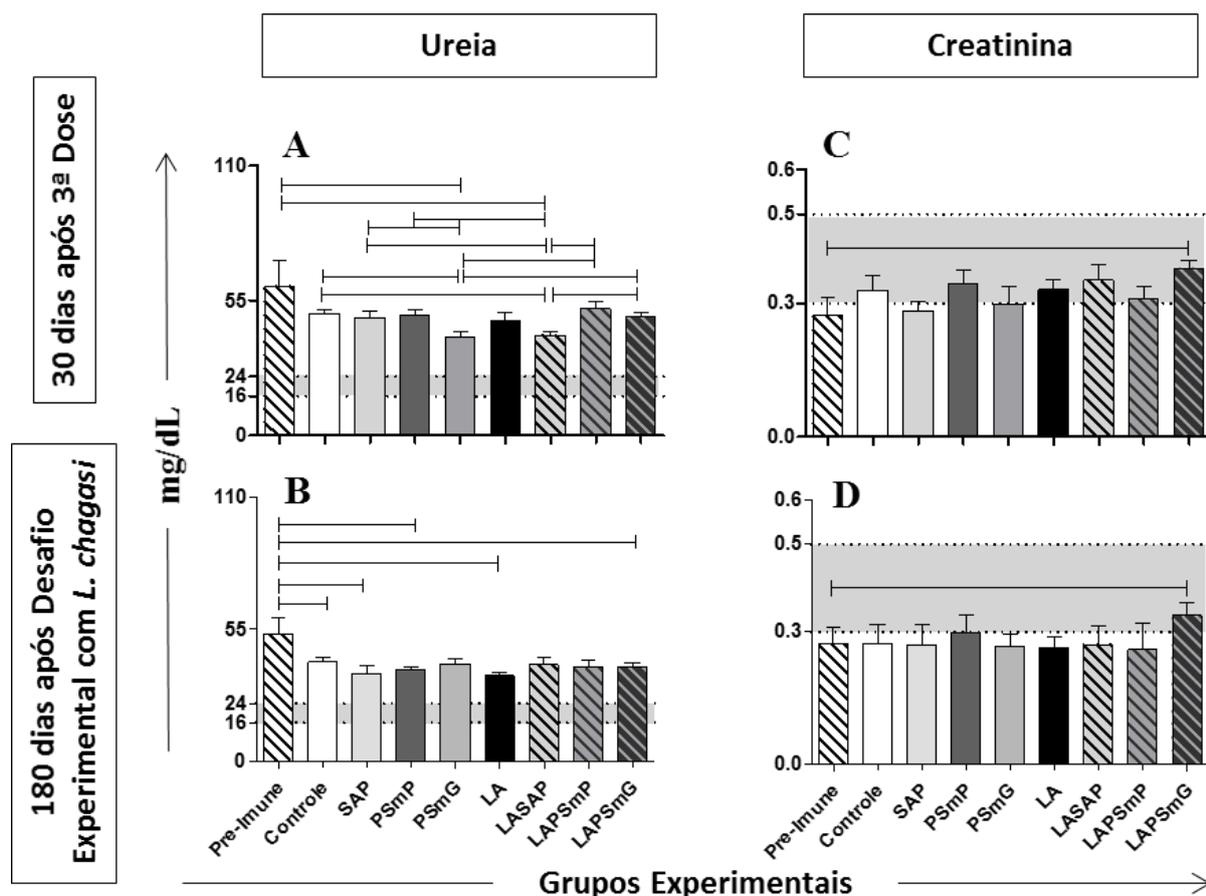


Figura 7 - Níveis séricos de ureia e creatinina em hamsters dourados, após 30 dias da terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180), considerando os diferentes grupos experimentais, representados pelas siglas Pré-imune, Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associada a *L. amazonensis* (LAPSmp); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Os gráficos ilustram a quantidade de ureia e creatinina (mg/dL), pelos valores da média±desvio padrão, nos tempos T3 e T180. As linhas tracejadas, no intervalo contido pelo retângulo cinza de cada gráfico, representam os valores máximos e mínimos considerados normais em hamsters, conforme descrito por Wolford *et al.*, (1986). As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p < 0,05$).

6.6 Eritrograma

As alterações relacionadas ao eritrograma (série vermelha) estão apresentadas na Figura 8 os valores do número de hemácias, plaquetas e níveis de hemoglobina foram os parâmetros analisados associados a série vermelha do sangue.

A análise do número de hemácias em T3 revelou redução ($p < 0,05$) nos grupos Controle (8.32 ± 0.34), SAP (8.07 ± 0.33), LASAP (7.80 ± 0.80) e LAPSmp (8.3 ± 0.26) em relação ao grupo LA (8.58 ± 0.47) (Figura 8A).

De forma semelhante, após o desafio experimental (T180) os dados obtidos estão dentro dos limites de normalidade para hamster. Entretanto a análise estatística entre os grupos avaliados revelou redução ($p<0,05$) do número de hemácias nos grupos Controle (6.92 ± 0.65), PSmP (6.96 ± 0.76), PSmG (6.79 ± 0.43); LA (7.03 ± 0.27), LASAP (6.87 ± 0.39), LAPSmP (7.01 ± 0.61) e LAPSmG (6.7575 ± 0.54) em relação ao grupo Pré-imune (8.27 ± 1.12) (Figura 8A).

A análise das plaquetas, em T3 e T180, revelou níveis abaixo da faixa considerada normal (Figura 8).

A análise da quantidade de hemoglobina revelou redução ($p<0,05$) nos grupos PSmP (13.40 ± 1.16), PSmG (13.56 ± 0.63) em relação ao grupo LA (14.5 ± 0.34) (Figura 8C).

Embora tenham sido identificadas alterações no número de hemácias e na quantidade de hemoglobina, os valores descritos neste estudo estão dentro dos limites de normalidade para hamsters.

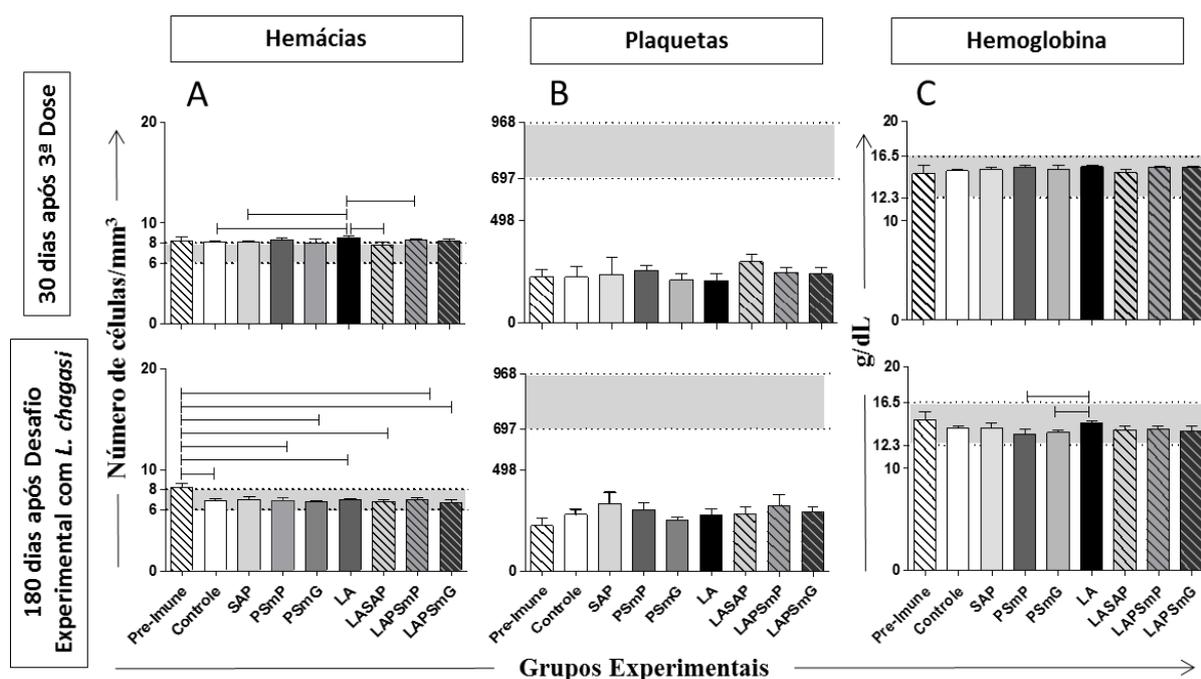


Figura 8 - Eritrograma de hamsters dourados, 30 após a terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180), considerando os diferentes grupos experimentais, representados pelas siglas Pré-imune, Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associada a *L. amazonensis* (LAPSmP); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Os gráficos ilustram o número absoluto (número de células/mm³) de hemácias (A), plaquetas (B), bem como a quantidade de hemoglobina (g/dL; C), pelos valores da média±desvio padrão, nos tempos T3 e T180. As linhas tracejadas, no intervalo contido pelo retângulo cinza de cada gráfico, representam os valores máximos e mínimos considerados normais em hamsters, conforme descrito por Wolford *et al.*, (1986). As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p<0,05$).

6.7 Leucograma

A avaliação do leucograma, 30 dias após a terceira imunização (T3) e 180 dias após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180) está ilustrado pela Figura 9, e descreve o número absoluto da global de leucócitos (A), e as populações de neutrófilos (B), monócitos (C), eosinófilos (D) e linfócitos (E).

No tempo T3, o grupo LASAP (9378 ± 2287) apresentou aumento ($p < 0,05$) da global de leucócitos em relação ao grupo Controle (7566 ± 2117). Este resultado foi caracterizado pelo aumento ($p < 0,05$) da população de neutrófilos no grupo LASAP (3649 ± 2407) em relação ao grupo Controle (1956 ± 801). Vale destacar ainda que houve a presença de monocitose ($p < 0,05$) nos grupos PSmG (129 ± 76) em relação aos grupos PSmP (47 ± 45) e LA (36 ± 39). Eosinofilia ($p < 0,05$) também foi observada no tempo T3 para os grupos SAP (142 ± 53), PSmP (178 ± 161), PSmG (115 ± 87), LA (150 ± 97), LAPSmP (216 ± 128) e LAPSmG (181 ± 127), em relação ao grupo Controle (74 ± 93). De forma interessante, foi observada linfocitose ($p < 0,05$) no grupo LAPSmG (5186 ± 1071) ao se comparar com o período pré-imune (3975 ± 1594). Assim foram identificadas alterações no T3 os valores descritos neste estudo estão dentro dos limites de normalidade para hamsters.

Além disso, no tempo T180 foi observado leucopenia os grupos SAP (4437 ± 833), LA (4558 ± 564) e LAPSmP (4975 ± 1903) eles apresentaram aumento ($p < 0,05$) da global de leucócitos em relação ao grupo Controle (3693 ± 1072). Assim também foi observado aumento ($p < 0,05$) da população de neutrófilos no grupo SAP (2672 ± 1157) e LA (2114 ± 725). Também houve a presença de monocitose ($p < 0,05$) nos grupos SAP (246 ± 122) e LAPSmP (228 ± 157) em relação ao grupo controle (161 ± 83). Eosinofilia ($p < 0,05$) também foi encontrada no tempo T180 para os grupos LA (106 ± 88) e LAPSmP (135 ± 290) em relação ao grupo controle (35 ± 31). Além disso também foi observada linfocitose ($p < 0,05$) no grupo LAPSmP (3483 ± 1506) em relação ao grupo controle (1924 ± 668).

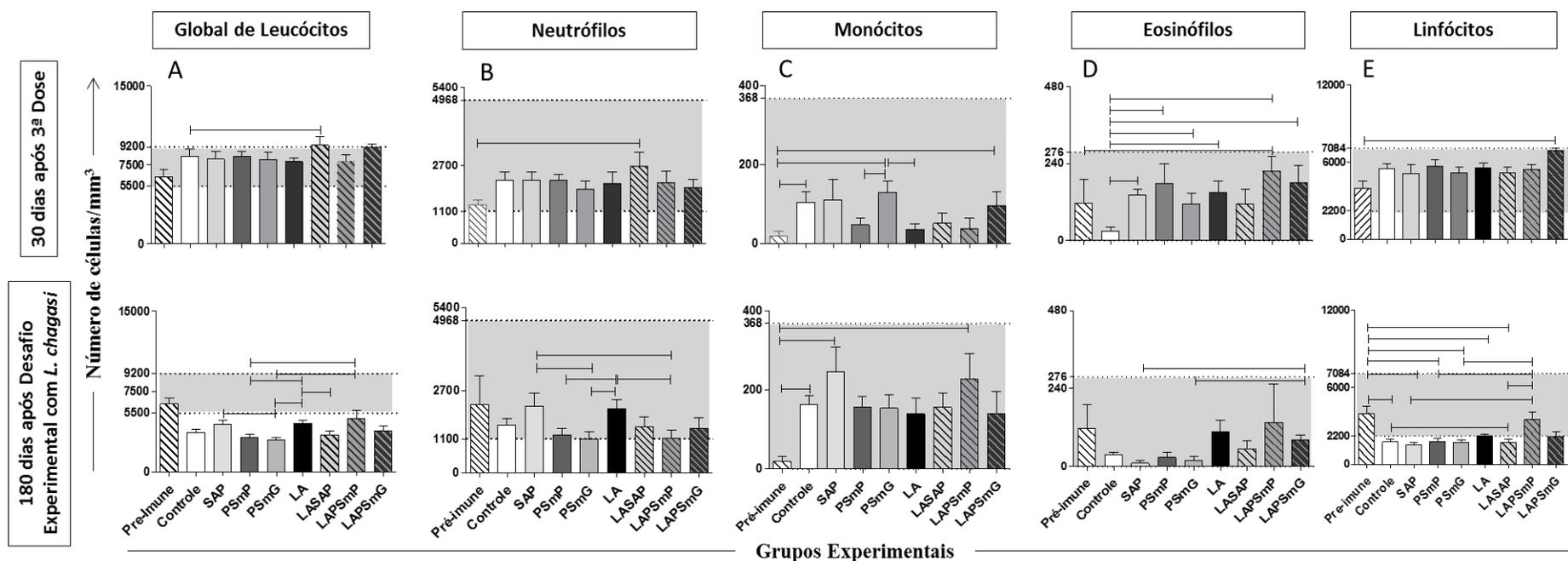


Figura 9 - Leucograma de hamsters dourados, 30 dias após a terceira imunização (T3) e após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180), considerando os diferentes grupos experimentais, representados pelas siglas Pré-imune, Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associado a *L. amazonensis* (LAPSmP); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Os gráficos ilustram o número absoluto (número de células/mm³) das diferentes populações analisadas, pelos valores da média±desvio padrão, nos tempos T3 e T180. As linhas tracejadas, no intervalo contido pelo retângulo cinza de cada gráfico, representam os valores máximos e mínimos considerados normais em hamsters, conforme descrito por Wolford *et al.*, (1986). As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p < 0,05$)

6.8 Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada por meio da presença de reatividade de imunoglobulinas IgG-anti *L. chagasi*, utilizando o método de ELISA indireta. A avaliação foi realizada nos tempos T3 (30 dias após a terceira dose de vacinação) e T180 (180 dias após o desafio experimental com *L. chagasi*).

Os resultados mostraram que após a terceira imunização houve aumento significativo da reatividade de IgG total anti-*L. chagasi*, ao se comparar todos os diferentes grupos experimentais que foram imunizados com antígenos de *L. amazonensis* LA: (0.13 ± 0.04); LASAP: (0.19 ± 0.03); LAPSmP: (0.12 ± 0.03); LAPSmG: (0.16 ± 0.05) em relação ao grupo Controle (0.05 ± 0.05) (Figura 10). Vale ressaltar ainda a média das absorvâncias de todos os grupos imunizados com antígenos de *L. amazonensis* apresentaram-se acima do *cut-off* (Figura 10). De forma geral, 180 dias após o desafio experimental com *L. chagasi* (T180), todos os grupos (com exceção do grupo pré-imune) apresentaram valores de absorvância acima do *cut-off* (Figura 10). Interessantemente, no T180, houve aumento ($p < 0,05$) da reatividade sérica de IgG total no grupo LAPSmG (1.92 ± 0.55) em relação ao grupo LAPSmP (1.04 ± 1.51).

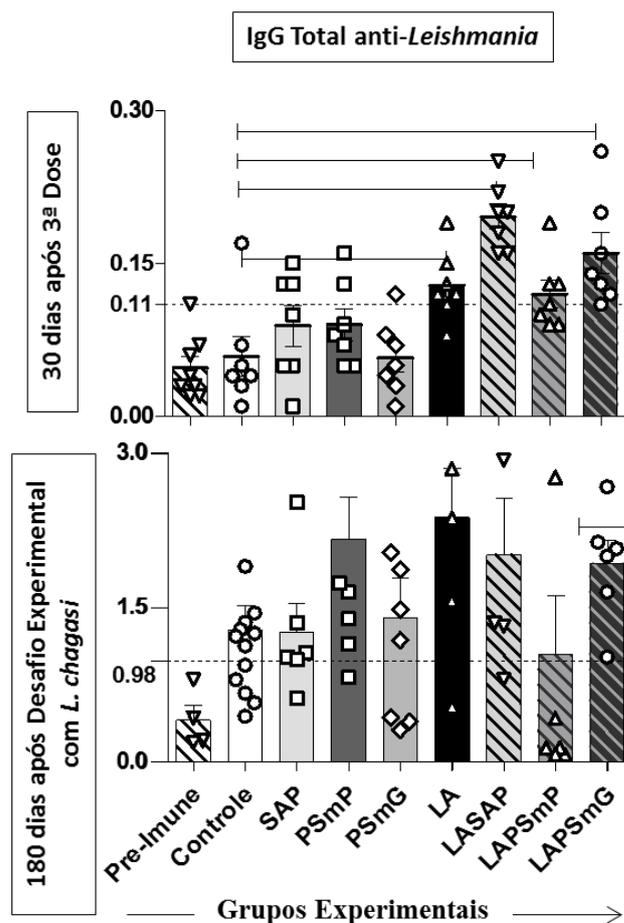


Figura 10 - Reatividade de IgG total anti-*L. chagasi* obtida a partir de amostras de soros de hamster. Os grupos experimentais foram representados pelas siglas Pré-imune, Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associado a *L. amazonensis* (LAPSmp); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). O “cut-off” ilustrado como linha pontilhada no gráfico, e utilizado para avaliar a reatividade presente nas amostras (no T3 e no T180) está representado pela média dos valores das absorbâncias da amostra de soro pré-imune somada ao valor de duas vezes o desvio padrão. As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p < 0,05$).

6.9 Avaliação da carga parasitária no baço e fígado

A análise da carga parasitária no baço (Figura 11A) e no fígado (Figura 11B) foi avaliada de forma comparativa entre os diferentes grupos após o desafio com *L. chagasi* (Controle, SAP, PSmP, PSmG, LA, LASAP, LAPSmP, LAPSmG), e os resultados estão ilustrados na Figura 11A. De forma interessante, a carga parasitária no baço do grupo experimental LAPSmG (2261 ± 5108) foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle (85012 ± 189577) e LA (17590 ± 19255). Estes dados mostram que houve uma diminuição de 97.34% da carga parasitária esplênica quando comparada ao grupo controle infectado.

Além disto, ao se avaliar a carga parasitária no fígado (Figura 11B), foi observado redução ($p < 0,05$) do parasitismo hepático nos animais dos grupos PSmP (10309 ± 29157), LAPSmP (966 ± 1702) e LAPSmG (1020 ± 2499) quando comparados ao grupo controle. Estes resultados resultaram em redução na carga parasitária de 98,14% no grupo LAPSmP e de 98,03% no grupo LAPSmG (Figura 11B)

No presente estudo foi avaliado a possível correlação entre a carga parasitária no baço e a reatividade de IgG total nos diferentes grupos experimentais. Os resultados obtidos mostraram correlação positiva entre a carga parasitária no baço e a reatividade de IgG no grupo Controle ($p = 0,011$; $r = 0,488$), SAP ($p = 0,006$; $r = 0,876$). Nos demais grupos não se observou correlação entre as variáveis analisadas (Figura 11C).

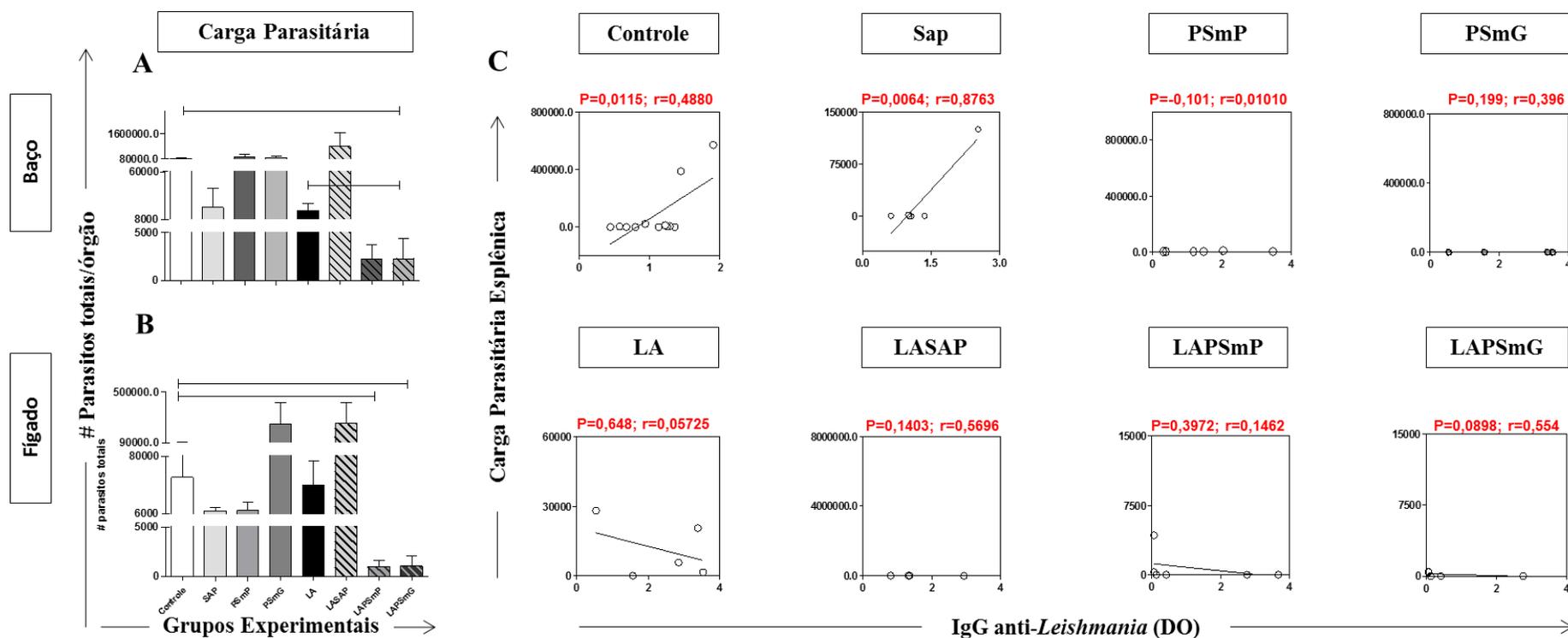


Figura 11 - Carga parasitária obtida a partir do baço (A), fígado (B) e correlação entre os níveis de IgG total anti-*L. chagasi* e a carga parasitária esplênica (C), empregando-se o método de diluição limitante. Os gráficos representam os resultados observados em hamsters dourados, até a data da eutanásia, nos diferentes grupos experimentais, entre os quais: Controle; Saponina (SAP); Partícula Submicrométrica Pequena Vazia (PSmP); Partícula Submicrométrica Grande Vazia (PSmG); Antígeno bruto de *L. amazonensis* (LA); Antígeno bruto *L. amazonensis* associado a Saponina (LASAP); Partícula Submicrométrica Pequena associada a *L. amazonensis* (LAPSmP); Partícula Submicrométrica Grande associada a *L. amazonensis* (LAPSmG). Os resultados estão representados como média±desvio padrão da carga parasitária. As linhas conectoras apresentadas acima das barras indicam a presença de diferença estatística ($p<0,05$).

7. Discussão

A leishmaniose é uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas com alta morbidade e mortalidade em todo o mundo, apresentando 350 milhões de pessoas em 98 países em risco de contrair a infecção. Além disso, cerca de 1,0 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 200,000 a 500,000 casos de leishmaniose visceral (LV) são registrados anualmente no mundo (SWARTZ *et al.*, 2012). O tratamento da leishmaniose ainda é baseado no uso da administração parenteral de antimoniais pentavalentes. No entanto, os efeitos adversos associados ao tratamento aliado ao aumento da resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes aponta para a necessidade e importância do desenvolvimento de estratégias imunoproláticas anti-LV (CROFT, 2003; REIS *et al.*, 2010). Por conseguinte, o desenvolvimento de novas estratégias imunoproláticas contra as leishmanioses deve ser considerado como prioridade (COSTA, 2011). Neste sentido, novas formulações vacinais empregando-se biomateriais em nanoformulações com antígenos de *Leishmania* poderiam compor uma estratégia interessante, a medida em que proporcionam liberação controlada e direcionamento dos antígenos às APC (ANDORKO, *et al.*, 2014; IRVINE *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente estudo buscou contribuir com uma nova formulação contendo antígenos de *Leishmania* encapsulados em partículas submicrômicas. Deste modo, os resultados obtidos revelaram, de um modo em geral, que as diferentes formulações foram bem toleradas pelos animais. Entretanto, vale destacar a presença de nódulos e pequenas ulcerações, consideradas discretas, no local do inóculo de alguns animais que receberam a Partícula Submicrométrica Grande vazia (grupo PSmG) ou associada ao antígeno de *L. amazonensis* (grupo LAPSmG). Alterações no local do inóculo, após administração de injeção cujo antígeno de *L. amazonensis* está presente, já foram observadas por OSORIO *et al.* (1998) em hamsters inoculados experimentalmente. É possível que o modelo hamster apresente maior susceptibilidade aos antígenos deste parasito, manifestando mais facilmente alterações locais após inóculo vacinal, a semelhança dos sinais clínicos observados em humanos com leishmaniose, principalmente associado as lesões ulcerativas. Outros estudos também têm mencionado que o hamster desenvolve lesões na pele quando são infectadas por *L. amazonensis* em decorrência do estabelecimento da infecção (FIGUEIREDO *et al.* 1999). Apesar das alterações ocorridas no local do inóculo, diferentes estudos demonstraram também que as vacinas desenvolvidas a partir de antígeno bruto autoclavado de *L.*

amazonensis, apresentam-se seguros para aplicação (KUMARI *et al.*, 2009). Além disso, as lesões podem desenvolver como resposta inflamatória devido à infiltrados celulares, constituídas principalmente por linfócitos, células plasmáticas, e macrófagos infectados por *Leishmania*, (KUMARI *et al.*, 2009).

Além das alterações no local do inóculo, a análise de inocuidade e toxicidade das diferentes formulações avaliadas neste estudo, contou com uma abordagem para avaliar alterações sistêmicas, como por exemplo a manutenção do peso dos animais. Deste modo, foi observado aumento da massa corporal dos hamsters dos grupos LA e LAPSmG no período pós-desafio (T180). Este resultado parecer indicar que a presença do antígeno de *L. amazonensis*, isoladamente ou formulado com a partícula submicrométrica grande, foi capaz manter o ganho de peso dos animais mesmo após o desafio experimental. Este achado pode ser considerado importante uma vez que outros estudos demonstraram haver diminuição no ganho de peso de animais vacinados com antígenos de *Leishmania spp.* (TRAVI *et al.*, 2002). Além disso, diferentes estudos relataram haver diminuição no ganho de peso corporal e que isto pode ser um indicador precoce de progressão da doença (WYLLIE e FAIRLAMB, 2006). Buscando ampliar o estudo do ganho de peso dos animais, foi avaliado ainda o peso do baço e fígado, que poderiam contribuir para o peso final dos animais, visto que a hepatomegalia e esplenomegalia é uma característica da LV (CUERVO-ESCOBAR *et al.*, 2014). De fato, tem sido descrito que a infecção em hamster com *L. donovani* resultou em um aumento significativo no peso dos órgãos afetados como baço, fígado, induzindo elevada carga parasitária nestes órgãos, desencadeando em uma progressão fatal da doença (MOREIRA *et al.*, 2012). No presente estudo foi observado que o peso do baço foi menor no grupo vacinado com LAPSmG e maior nos grupos LA e LASAP. Estes resultados indicam que a vacinação com LAPSmG foi capaz de proteger contra a esplenomegalia, caracteristicamente relatada como achado anatomopatológico da LV em hamsters (MOREIRA *et al.*, 2012).

Buscando avaliar o impacto do desafio experimental nos diferentes grupos avaliados, foi realizada a análise da função hepática e renal. Vale ressaltar grandes variações nos valores hematológicos e bioquímicos podem ser induzidos em função da idade, sexo, criação, dieta, temperatura, além da excitação proveniente da contenção do animal no momento da coleta de sangue (WEISER, 2007). Neste sentido, as análises bioquímicas das enzimas AST e ALT (teste de função hepática). Assim as alterações encontradas na concentração das enzimas

alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são importantes indicadores de lesões hepáticas e também os níveis de concentração das enzimas permitem averiguar a presença de alterações da permeabilidade dos hepatócitos quando se observa elevação simultânea dos níveis séricos de ALT e AST (KANEKO, 1997).

Estes dados fornecem subsídios de alterações na função hepática e que a elevação da atividade de ALT e AST em T3 poderia ser indicativa de alguma lesão hepática (QUEIROZ *et al.*, 2004). Entretanto, vale destacar que o grupo pré-imune (além dos grupos Controle, SAP, PSmP, LA e LAPSmP) apresentou elevação a acima dos valores máximos de ALT e AST. Este resultado parece indicar que poderia ter havido algum problema na realização do teste de função hepática, já que o grupo pré-imune corresponde a animais saudáveis, e que representam os diferentes grupos avaliados. Deste modo, não é possível constatar que houve alteração no teste de função hepática. Além disto, após o desafio experimental, seria esperado haver alguma alteração da função hepática. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração em T180, corroborando com a hipótese de possivelmente ter havido algum problema no teste de função hepática realizado no tempo T3.

A avaliação da função renal consiste principalmente na dosagem dos níveis séricos de ureia e creatinina (teste de função renal) mostraram alterações significativas apenas nos níveis de ureia, em T3 e T180 e não houve alteração nos níveis de creatinina no tempo T3 e T180. Como não houve alteração simultânea dos níveis de ureia, junto aos níveis de creatinina, acima do limiar máximo considerado normal para hamsters, é possível concluir que não ocorreu alteração da função renal entre os diferentes grupos avaliados em T3 e T180.

A série vermelha também foi avaliada com o intuito de se verificar a ocorrência de anemia e hemólise, que poderiam estar associadas a toxicidade das formulações (GIUNCHETTI *et al.*, 2007) ou mesmo ser reflexo da infecção experimental (MOREIRA *et al.*, 2012). Assim, embora alterações tenham sido observadas na série vermelha em T3 e T180, estiveram dentro do limite de normalidade descrito para hamsters. Assim, o presente estudo não observou anemia nos diferentes grupos, identificando que as formulações utilizadas não induziram alterações na série vermelha (anemia e hemólise). Da mesma forma, após o desafio experimental (T180), também não foi observado alteração na série vermelha. Entretanto, a presença de anemia foi demonstrada em 70-80% dos hamsters experimentalmente infectados com diferentes formas de *L. infantum* (amastigotas e promastigotas) (RICA-CAPELA *et al.*

2003). A anemia poderia ser induzida por perda de sangue, lise de hemácias e diminuição da eritropoiese, ou ainda em função de hipoplasia e aplasia medular (FEITOSA *et al.*, 2000).

A avaliação da resposta celular contou com a análise dos parâmetros do leucograma. Os resultados classicamente esperados após a infecção por *L. chagasi*, em animais não imunizados, são inicialmente aumento de leucócitos totais (leucocitose) e de neutrofilia seguido pela leucopenia e marcada diminuição do número de linfócitos (PERSON e QUEIROZ-SOUSA, 1996). Este perfil de resposta tem sido associado ao quadro clínico da LV e a progressão da doença (BOURDOISEAU *et al.* 1997). De forma geral, após a vacinação (T3), foram observadas alterações no leucograma, dentro dos limites de normalidade para hamsters. Entretanto, chamou a atenção a linfocitose presente no grupo LAPSmG, possivelmente induzida pelo processo de imunização. Após o desafio experimental (T180), foi observado leucopenia (PERSON e QUEIROZ-SOUSA, 1996) em todos os grupos avaliados, exceto o pré-imune. Além disso, foi observado que a população de neutrófilos (LA, SAP e LAPSmG), monócitos, eosinófilos estão dentro dos limites de normalidade e os grupos LAPSmP e LAPSmG apresentaram níveis basais de linfócitos; entretanto, houve linfocitopenia nos grupos Controle, SAP, PSmP, PSmG, LA e LASAP. A linfocitose induzida pelo processo de imunização contra a LV tem sido descrito como evento importante relacionado ao estabelecimento de imunogenicidade (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008) e imunoproteção (ROATT *et al.*, 2012; AGUIAR-SOARES *et al.* 2014).

O estudo de antigenicidade vacinal foi realizado pela análise dos níveis de IgG anti-*Leishmania* nos diferentes grupos avaliados. Deste modo, foi demonstrado aumento dos níveis de IgG total em T3 nos grupos contendo antígeno de *L. amazonensis* na formulação vacinal (LA, LASAP, LAPSmP e LAPSmG). Este resultado demonstrou antigenicidade destas formulações uma vez que apresentaram intensa resposta imune humoral. Após o desafio experimental (T180), todos os grupos avaliados apresentaram indução da resposta imune humoral. Este resultado indica a influência do desafio experimental por *L. chagasi* na indução de IgG anti-*Leishmania*. Estes achados corroboram outros estudos os quais demonstram aumento da resposta humoral em hamster infectados experimentalmente com *L. infantum* (REQUENA *et al.*, 2000; MELBY *et al.*, 2001; RICA-CAPELA *et al.*, 2003). Vale destacar que a formulação contendo o polímero ácido poli-*D,L*-lático (PLA) foi utilizada no presente

estudo com o objetivo de favorecer a resposta imune através da apresentação de antígeno via APC (O'HAGAN e RAPPUOLI, 2006). Além disso o polímero tem propriedades imunoestimulantes intrínsecas mesmo na ausência de antígenos (ANDORKO *et al.*, 2014). De fato, ao se avaliar a resposta imune humoral, a formulação LAPSmG induziu uma proeminente produção de IgG anti-*Leishmania* após vacinação (T3) e após o desafio experimental (T180), apontando para a capacidade de antigenicidade desta formulação vacinal.

Vale ressaltar que a hipótese considerada no presente estudo é que o antígeno bruto de *L. amazonensis*, utilizado nas diferentes formulações, seria capaz de induzir uma resposta imune protetora contra o desafio experimental por *L. chagasi* em hamsters. Deste modo, esta hipótese foi baseada na possibilidade de indução de uma resposta Th1, contribuindo desta forma para controlar a replicação do parasito.

Com o objetivo de avaliar esta hipótese, os diferentes grupos vacinais foram submetidos ao desafio experimental e avaliados durante 180 dias (T180). Assim, o baço e o fígado dos animais foi utilizado para análise da carga parasitária, e verificação do potencial imunoprotetor das diferentes formulações vacinais. É importante analisar a carga parasitária porque diferentes estudos demonstram haver correlação entre maior carga parasitária e gravidade da doença (LIMA, *et al.*, 1997). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que formulação LAPSmG foi a única capaz de reduzir simultaneamente a carga parasitária no baço e no fígado, em relação ao grupo controle. Esta redução da carga parasitária foi de 97,34% no baço e 98,03% no fígado para a formulação LAPSmG em relação ao grupo controle. Vale ressaltar ainda que a segunda formulação a apresentar melhor desempenho da carga parasitária foi a LAPSmP, induzindo redução de 97,43% do parasitismo esplênico e 98,14% do parasitismo hepático.

Destaca-se ainda que os dados da correlação entre os níveis de IgG anti-*Leishmania* e a carga parasitária esplênica mostrou correlação positiva nos grupos Controle, SAP. Estes dados parecem corroborar resultados prévios da literatura indicando que a ativação policlonal de células B está associada a progressão da LV, com conseqüente aumento da carga parasitária (MOREIRA *et al.*, 2012), que seriam marcantes nestes grupos que apresentaram maior susceptibilidade a infecção experimental.

As formulações baseadas nas partículas submicrométricas foram empregadas neste trabalho com o intuito de se melhorar a resposta imune do antígeno encapsulado (*L.*

amazonensis) e, desta forma, proporcionar maior resposta protetora após o desafio com *L. chagasi*. De fato, os resultados observados neste estudo estão de acordo com outros estudos os quais demonstraram que a encapsulação antigênica aumenta a biodisponibilidade, a dinâmica celular e apresentam liberação controlada do princípio ativo (KHANDARE *et al.*, 2010), além de aumentar sua interação com às APC, favorecendo o estabelecimento de uma resposta imune Th1 (NEWMAN *et al.*, 2002). Estas características são cruciais para induzir aumento da imunogenicidade vacinal (CALDERON *et al.*, 2010), caracteristicamente observada nas formulações LAPSmP e LAPSmG deste estudo.

8. Conclusões

O os dados obtidos no presente trabalho mostraram que o emprego do polímero poli-*D,L*-lático (PLA) e quitosana formulado em partículas submicrométricas associado ao antígeno bruto de *L. amazonensis* (formulações LAPSmP e LAPSmG) foram inócuos e seguros para administração em hamsters, além de serem imunogênicos e reduzirem drasticamente o parasitismo tecidual. Esta afirmação é baseada nos seguintes achados: (i) alterações locais e clínicas compatíveis com a manutenção dos animais; (ii) testes de função hepática e renal sem alterações; (iii) ausência de anemia e hemólise induzida durante o protocolo vacinal; (iv) indução de linfocitose após o término do protocolo vacinal, particularmente relacionada a formulação LAPSmG; (v) antigenicidade relacionada a produção de IgG total anti-*Leishmania* após o término do protocolo vacinal; (vi) redução do tamanho do baço, após o desafio experimental por *L. chagasi*, particularmente relacionada a formulação LAPSmG; (vii) redução da carga parasitária superior a 97% no baço e no fígado.

9. Referências bibliográficas

- Aguiar-Soares R.D.; Roatt B.M.; Ker H.G.; Moreira Nd.; Mathias F.A.; Cardoso J.M.; Gontijo N.F.; Bruna-Romero O.; Teixeira-Carvalho A.; Martins-Filho O.A.; Corrêa-Oliveira R.; Giunchetti R.C.; Reis A.B. (2014) 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*. *Parasit Vectors*. 7; p 7:61.
- Aguilar, J.C.; Rodriguez, E.G. (2007) Vaccine adjuvants revisited *Vaccine*. v.25 (19), p. 3752–3762.
- Ali, N.; Nakhasi, H.L.; Valenzuela, J.G.; Reis, A.B. (2014) Targeted Immunology for Prevention and Cure of VL. *Front Immunol*. 19; v.5 p.660.
- Alvar, J.; Velez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux,P.; Cano, J. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. v.7, p. e35671.
- Amrita, Das and Nahid, Ali. (2014) Combining Cationic Liposomal Delivery with MPL-TDM for Cysteine Protease Cocktail Vaccination against *Leishmania donovani*: Evidence for Antigen Synergy and Protection. *PLoS Negl Trop Dis.*, vol 8(8) p. e3091.
- Andorko, J.I.; Hess, K.L.; Jewell, C.M. (2014) Harnessing biomaterials to engineer the lymph node microenvironment for immunity or tolerance. *AAPS J.* (2014), pp. 1–16.
- Araújo, M.S.; de Andrade, R.A.; Sathler-Avelar R.; Magalhães, C.P.; Carvalho, A.T.; Andrade, MC.; Campolina, S.S.; Mello, M.N.; Vianna, L.R.; Mayrink, W.; Reis, A.B.; Malaquias, L.C.; Rocha, L.M.; Martins-Filho, O.A. (2011) Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol*, v.141, p. 64.
- Araújo, M.S.; de Andrade, R.A.; Vianna, L.R.; Mayrink, W.; Reis, A.B.; Sathler-Avelar, R.; Teixeira-Carvalho, A.; Andrade, M.C.; Mello, M.N.; Martins-Filho, O.A. (2008) Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8⁺ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis.. *Vaccine*, v.26 (18), p. 2211.
- Baharia R.K.; Tandon R.; Sharma T.; Suthar M.K.; Das S.; Siddiqi M.I.; Saxena J.K.; Sundar S.; Dube A. (2015). Recombinant NAD-dependent SIR-2 protein of *Leishmania donovani*:

- immunobiochemical characterization as a potential vaccine against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6; 9(3) :e0003557.
- Basu, R.; Bhaumik, S.; Basu, J.M.; Naskar, K.; De T.; Roy, S. (2005) Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.174 (11), p. 7160-7171.
- Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C. (1997) Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.56, n.3-4, p.345-51.
- Brittingham, A.; Mosser, D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today* v.12, p.444–7.
- Calderón, M.; Quadir, M.; Strumia, M. and Haag R. (2010) Functional dendritic polymer architectures as stimuli-responsive nanocarriers. *Biochimie* v.92(9), p.1242-1251.
- Champion, J.A.; Mitragotri, S. (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (13), p. 4930–4934.
- Champsi, J.; McMahon-Pratt, D. (1988) Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun*, v.56, p. 3272-3279.
- Choudhury, R.; Das P.; De T., (2013) 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN- γ induced down-regulation of TNF- α mediated MMP-9 activity *Immunobiology*, v.218 (1), p.114.
- Coelho, E.A.; Tavares, C.A.; Carvalho, F.A.; Chaves, K.F.; Teixeira, K.N.; Rodrigues, R.C.; Charest, H.; Matlashewski, G.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P. (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.*, v.71(7), p.3988–94.
- Costa, C.H.N. (2011) How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 44(2), p. 232–42.
- Cox, J.C. and Coulter, A.R. (1997) Adjuvants a classification and review of their modes of action. *Vaccine.* v.15(3) p.248-56.

- Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* v19 p.111-126.
- Croft, S.L.; Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis-Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* .v. 19(11), p.502–8.
- Cuervo-Escobar, S.; Losada-Barragán, M.; Umaña-Pérez, A.; Porrozzì, R.; Saboia-Vahia, L.; Miranda, L.H.; Morgado, F.N.; Menezes, R.C.; Sánchez-Gómez, M.; Cuervo, P. (2014) T-cell populations and cytokine expression are impaired in thymus and spleen of protein malnourished BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*. *PLoS One.* v.9(12), p.e114584.
- De Oliveira Gomes, D.C.; DA Silva Costa Souza, B.L.; DE Matos Guedes, H.L.; Lopes, U.G.; Rossi-Bergmann, B. (2011) Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitology* v.138(14) p.1892–1897.
- Diwan, M.; Tafaghodi, M. and Samuel, J. (2002) Enhancement of immune responses by Co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *Journal of Controlled Release* v.85(1-3) p.247-262.
- Doroud, D.; Rafati, S. (2012) Leishmaniasis: focus on the design of nanoparticulate vaccine delivery systems *Expert Rev Vaccines.* v.11 (1), p. 69–86.
- Dubensky, Jr. T.W. (2010) Reed Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol.* v.2(3), p. 155–161.
- Feitosa, M.M. I.; Luvizotto, F.A. (2000) Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo. v.5, p.36-44.
- Fernandes, A.P.; Costa, M.M.; Coelho, E.A.; Michalick, M.S.; de Freitas, E.; Melo, M.N.; Luiz Tafuri, W.; Resende, D.; Hermont, V.; Abrantes, Cde F.; Gazzinelli, R.T. (2008) Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v.26(46), p.5888- 5895.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P.H; Ammouy, N.; Benita, S. (1989) Nanocapsula Formation by Interfacial polymer deposition flowing solvent displacement *international journal of pharmacy.* v.55, R1 – R4.
- Figueiredo, E. M.; Costa e Silva, J.; Brazil, R. P. (1999) Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania)*

- chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v.32(2), p.191–193.
- Fruth, U.; Solioz, N.; Louis, J.A. (1993) *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. J Immunol v.150(5) p.1857-1864.
- Gavron, D.; Saul, A. (1997) Pioneer of tropical medicine, 0-86689-045-9 Balaban Publishers, Rehovot, Israel.
- Ghosh, A.; Zhang, W.W.; Matlashewski, G. (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. Vaccine, v.20(1-2), pp. 59–66.
- Giunchetti, R.C.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Vitoriano-Souza, J.; Moreira, N.D.; Malaquias, L.C.; Castro, L.L.M.; Lana, M.; Reis, A.B. (2007) Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine, v.25 (44), p.7674-86.
- Giunchetti, R.C.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Coura-Vital, W.; Abreu, R.T.; Malaquias, L.C.; Gontijo, N.F.; Brodskyn, C.; Oliveira, C.I.; Costa, D.J.; Lana, M.; Reis, A.B. (2008b) A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. Vaccine, v. 26(5), p.623-638.
- Giunchetti, R.C.; Reis, A.B.; Silveira-Lemos, D.; Martins-Filho, O.A.; Corrêa-Oliveira, R.; Bethony, J.; Vale, A.M.; Quetz, J.; Bueno, L.L.; França-Silva, J.C.; Nascimento, E.; Mayrink, W.; Fujiwara, R.T. (2008a) Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. Rev. Vet. Sci., v 85(1), p.106-112.
- Gomes, R.; Teixeira, C.; Teixeira, M.J.; Oliveira, F.; Menezes, M.J.; Silva, C.; de Oliveira, C.I.; Miranda, J.C.; Elnaiem, D.E.; Kamhawi, S.; Valenzuela, J.G.; Brodskyn, C.I. (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. v.105 (22), p. 7845-50.
- Gomes-Silva, A.; Valverde, J.G.; Ribeiro-Romão, R.P.; Plácido-Pereira, R.M.; Da-Cruz, A.M. (2013) Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology. v.140(6) p.771–779.

- Goto, H.; Lindoso, J.A. (2004) Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol Research*, v.37(4), p.615-623.
- Goto, H.; Prianti, M.G. (2009) Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v.51(5), p.241-246.
- Green, P. J.; Feizi, T.; Stoll, M.S.; Thiel, S.; Prescott, A.; McConville, M.J. (1994) Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.66(2), p.319–328.
- Gupta R.; Kumar V.; Kushawaha P.K.; Tripathi C.P.; Joshi S.; Sahasrabudde A.A.; Mitra K.; Sundar S.; Siddiqi M.I.; Dube A. (2014) Characterization of glycolytic enzymes--rAldolase and rEnolase of *Leishmania donovani*, identified as Th1 stimulatory proteins, for their immunogenicity and immunoprophylactic efficacies against experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 24;9(1):e86073.
- Gupta A. Gupta R.K.; Gupta G. (2009) Targeting cells for drug and gene delivery: emerging applications of mannans and mannan binding lectins *J Sci Ind Res*, 68, p. 465–483.
- Gupta, S, Nishi. (2011) Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res*. v.133, p.27-39.
- Gurunathan, S; Sacks, D.L.; Brown, D.R.; Reiner, S.L.; Charest, H.; Glaichenhaus, N. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen offers protective immunity to mice infected with *Leishmania major* *J Exp Med*. v.186(7), p.1137–1147.
- Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. v.14(2), p.229-243.
- Handman, E.; Button, L.L.; McMaster, W.R. (1990) *Leishmania major*: production of recombinant gp63 its antigenicity and immunogenicity in mice. *Exp Parasitol*, v.70 (4), p. 427-435.
- Harhay, M.O.; Olliaro, P.L; Costa, D.L.; Costa, C.H.N. (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitolog*. v. 27(9), p.403–409.
- Irvine, D.J.; Swartz, M.A.; Szeto G.L. (2013) Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity. *Nat. Mater*. v.12(11), p. 978–990.
- Jaiswal A.K.; Khare P.; Joshi S.; Kushawaha P.K.; Sundar S.; Dube A. (2014) Th1 stimulatory proteins of *Leishmania donovani*: comparative cellular and protective

- responses of Triose phosphate isomerase, rProtein disulfide isomerase and rElongation factor-2 in combination with rHSP70 against visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 30;9(9):e108556.
- Jaiswal A.K.; Khare P.; Joshi S.; Rawat K.; Yadav N.; Sundar S.; Dube U. (2014) Immunological consequences of stress-related proteins--cytosolic trypanothione peroxidase and chaperonin TCP20--identified in splenic amastigotes of *Leishmania donovani* as Th1 stimulatory, in experimental visceral leishmaniasis.. *Parasitologia*. 2015. 142 (5), p. 728-44.
- Kamhawi, S.; Ramalho-Ortigao, M.; Pham, V.M.; Kumar, S.; Lawyer, P.G.; Turco, S.J.; Barillas-Mury, C.; Sacks, D.L.; Valenzuela, J.G. (2004) A role for insect galectins in parasite survival. *v.119(3)*, p.329–341.
- Kanchan, V, Panda, A.K. (2007) Panda Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*. v.28 (35), p. 5344–5357.
- Kane, M.M.; Mosser, D.M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol*. v.7(1), p. 26–31.
- Kaye, P.; Scott, P. (2011) Leishmaniasis: complexity at the hostpathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.9(8), p.604-615
- Kedzierski, L.; Zhu Y.; Handman, E. (2006) *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, v.133, p. 87-112.
- Kersten, G.; Hirschberg, H. (2004) Antigen delivery systems. *Expert Rev Vaccines*, v.3 (4), p. 453-462.
- Khamesipour, A.; Rafati, S.; Davoudi, N.; Maboudi, F.; Modabber, F. (2006) *Leishmaniasis* vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*, v.123 (3), p. 423–438.
- Khandare, J.; Mohr, A.; Calderon, M.; Welker, P.; Licha, K. and Haag, R. (2010) Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives *Biomaterials*, v.31(15), p.4268-4277.
- Kumar, R.; Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunol.*, v. 14;3:251

- Kumari, S.; Samant, M.; Khare, P.; Misra, P.; Dutta, S.; Kolli, B.K. (2009) Photodynamic vaccination of hamsters with inducible suicidal mutants of *Leishmania amazonensis* elicits immunity against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*, v.39 (1), p. 178-191.
- Kushawaha P.K.; Gupta R.; Tripathi C.D.; Khare P.; Jaiswal A.K.; Sundar S.; Dube A. (2012) *Leishmania donovani* triose phosphate isomerase: a potential vaccine target against visceral leishmaniasis. *PLoS One*.7(9):e45766.
- Laveran, A. e Mesnil, F. (1903) Sur um protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d` une fièwre de l`Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-961.
- Lemesre, J.L.; Holzmuller, P.; Goncalves, R.B.; Bourdoiseau, G.; Hugnet, C.; Cavaleyra, M. (2007) Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, v.25 (21), p. 4223-4234.
- Liew, F.Y.; Dhaliwal, J.S. (1987) Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from *Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites. *J Immunol*, v.138(12) p.4450-4456.
- Lima, H.C.; Bleyenbergh, J.; Titus, R.G. (1997) A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today*, v.13(2), p. 80-82.
- Linehan, S.A.; Martinez-Pomares, L.; Gordon, S. (2000) Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* v.479, p. 1-14 review.
- Liu, M.A.; Wahren, B.; Hedestam, G.B.K. (2006) DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum Gene Ther*, v.17 (11), p. 1051–1061.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193(1) p.265-275.
- Mann, J.F.; Shakir, E.; Carter, K.C.; Mullen, A.B.; Alexander, J.; Ferro, V.A. (2009) Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection *Vaccine*. v.27 (27), p. 3643–3649.
- Martin, V.; Vouldoukis, I.; Moreno, J.; McGahie, D.; Gueguen, S.; Cuisinier, A.M. (2014) The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with

- theLiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res.* Jun 25;45:69.
- Mathias, R.; Costa, F.A.; Goto, H. (2001) Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* v.34(4), p.539–543.
- Maurício, I.L.; Stothard, J.R.; Miles, M.A. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16(5), p.188-189.
- Mayrink, W.; Williams, P.; Da Costa, C.A. (1985) An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo. *Brazil Ann Trop Med Parasitol*, 79 (3), p. 259-269.
- Mazumdar T.; Anam K.; Ali N. (2005) Influence of phospholipid composition on the adjuvanticity and protective efficacy of liposome-encapsulated *Leishmania donovani* antigens. *J Parasitol*; 91(2):269-274.
- McConville, M.J.; Blackwell, J.M. (1991) Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J. Biol. Chem.* v.266(23), p. 15170–15179.
- McKerrow, J.; Engel, J.; Caffrey, C. (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem*, v.7(4), p. 639–644.
- McMahon-Pratt, D.; Alexander, J. (2004) Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease. *Immunol Rev.* v.201, p.206-224.
- McMahon-Pratt, D.; Traub-Cseko, Y.; Lohman, K.L.; Rogers, D.D.; Beverley, S.M. (1992) Loss of the GP46/M2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Mol Biochem Parasitol*, v.50(1), p. 151-160.
- Melby, P.; Tryon, V.; Chandrasekar, V.; Freeman, G.L. (1998) Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* v.66(5), p.2135-2142.
- Melby, P.C; Chandrasekar, B.; Zhao, W.; Coe, J.E. (2001) The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol*, v.166(3)p.1912-1920.
- Mendonça, C.A. (2011) Avaliação da proteção da vacina LBSapSal contra leishmaniose Visceral Canina, frente ao desafio intradérmico experimental com *Leishmania chagasi* e

- extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ouro Preto: Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, 87p.
- Mendonça, L.Z.; Resende, L.A.; Lanna, M.F.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Roatt, B.M.; Oliveira e Castro, R.A.; Batista, M.A.; Silveira-Lemos, D.; Gomes, J.A.S.; Fujiwara, R.T.; Rezende, S.A.; Martins-Filho, O.A.; Corrêa-Oliveira, R.; Dutra, W.O.; Reis, A.B. and Giunchetti, R.C. (2013) Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. Submetido à revista Vaccine.
- Ministério da Saúde, (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. 1º edição. 122p.
- Ministério da Saúde, (2007) Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Editora MS. 184 p.
- Paliwal, R.; Rai, S.; Vaidya, B.; Khatri, K.; Goyal, A.K; Mishra, N; Mehta, A.; Vyas, S.P. (2008) Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. *Nanomedicine* 5(2):184-91 v.5 (2), p. 184-191.
- Modabber, F. (1995) Vaccines against leishmaniasis *Ann Trop Med Parasitol*, (Suppl.1), p. 83–88.
- Mookerjee, A.; Sen, P.C.; Ghose, A.C. (2003) Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor β antibody. *Infect Immun*. v.71(5), p.2439-2446.
- Moreira, N.d.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, BM.; Vieira, P.M.; Ker, H.G; de Oliveira Cardoso, J.M.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, CM; de Lana, M.; Reis, A.B. (2012) Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: "*Leishman Donovan units*" versus real-time PCR. *PLoS One*. v.7(10), p.e47907.
- Moreno, J.; Vouldoukis, I.; Martin, V.; McGahie, D.; Cuisinier, A.M.; Gueguen, S. (2012) Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(6):e1683.
- Motta, C.B. (2011) Emprego de Diferentes Metodologias Diagnósticas na Avaliação da Proteção da Vacina LBSap contra Leishmaniose Visceral Canina frente ao desafio

- experimental intradérmico com Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* e extrato de Glândulas Salivares de *Lutzomyia longipalpis* (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ouro Preto: Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, 79p.
- Mukherjee, A.K.; Gupta, G.; Adhikari, A.; Majumder, S.; Kar-Mahapatra, S.; Bhattacharyya Majumdar, S.; Majumdar, S. (2012) Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9 *Int. Immunopharmacol.*, v. 12 (4), p. 565-572.
- Mutiso, J.M.; Macharia, J.C.; Gicheru, M.M. (2010) A review of adjuvants for *Leishmania* vaccine candidates *J Biomed Res.* v.24 (1), p. 16–25.
- Muyombwe, A.; Olivier, M.; Harvie, P.; Bergeron, M.G.; Ouellette, M.; Papadopoulou, B. (1998) Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis*, v.177 (1), p. 188-195.
- Newman, K.D.; Elamanchili, P.; Kwon, G.S. and Samuel, J. (2002) Uptake of poly(D,lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research* v.60(3) p.480-486.
- Nicolle, C.H. (1908) Culture des corps de Leishman isolés de La rate dans trois cas d'anémie splénique infantile. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v.1, p.121.
- Nieto, A.; Dominguez-Bernal, G.; Orden, J.A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N. (2011) Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res* v. 23;42:39.
- O'Hagan, D.T.; Rappuoli, R. (2006) Novel approaches to pediatric vaccine delivery. *Adv. Drug Del. Reviews.* v.58(1) p.29-51.
- Osorio, Y.S.; Gonzalez, J.; Gama, V.L.; Travi, B.L. (1998) Reinfection in American cutaneous leishmaniasis: evaluation of clinical outcomes in the hamster model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.93, p.353–356.
- Oyewumi, M.O.; Kumar, A.; Cui, Z. (2010) Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines*, v.9 (9), p. 1095–1107.

- Palatnik, C.B.; Borojevic, R.; Previato, J.O.; Mendonca-Previato, L. (1989) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect Immun*, v.57(3), p. 754-763.
- Pearson, R.D.; de Queiroz-Sousa, A. (1996) Clinical spectrum of leishmaniasis *Clin. Infect. Dis.*, v.22(1), p. 1-13.
- Pereira L.; Abbehusen M.; Teixeira C.; Cunha J.; Nascimento I.P.; Fukutani K.; dos-Santos W.; Barral A.; de Oliveira C.I.; Barral-Netto M.; Soto M. (2015) Vaccination with *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 but not with nucleosomal histones proteins controls *Leishmania infantum* infection in hamsters. *PLoS Negl Trop* 9(2):e0003490
- Perez, L.E.; Chandrasekar, B.; Saldarriaga, O.A.; Zhao, W.; Arteaga, L.T.; Travi, B.L. (2006) 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. *J Immunol.* v.176(9), p.5519-5528.
- Ravindran, R.; Ali, N. (2004) Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Current molecular medicine* 4(6) p. 697- 709.
- Reis A.B.; Giunchetti R.C.; Carrillo E.; Martins-Filho O.A.; Moreno J. (2010) Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2010 Jul;26(7):341-349.
- Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* v.7(9), p. 581–596.
- Requena, J.M.; Soto, M.; Doria, M.D.; Alonso, C. (2000) Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol*, v.76(3-4) p.269-281.
- Resende, L.A. (2011) Perfil de Citocinas e Níveis de Óxido Nítrico em Cães Vacinados com os Imunobiológicos LBSap e LBSapSal e Submetidos ao Desafio Experimental com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e saliva de *Lutzomyia longipalpis*. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia). Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 106p.
- Restifo, N.P.; Ying, H.; Hwang, L.; Leitner, W.W. (2000) The promise of nucleic acid vaccines *Gene Ther.* v.7(2), p. 89-92.

- Ribeiro-Gomes, F.L.; Moniz-de-Souza, M.C.; Alexandre-Moreira, M.S.; Dias, W.B.; Lopes, M.F.; Nunes, M.P.; Lungarella, G.; DosReis, G.A. (2007) Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol.* v.179(6), p.3988-3994.
- Ribeiro-Romão, R.P.; Moreira, O.C; Osorio, E.Y.; Cysne-Finkelstein, L.; Gomes-Silva, A. (2014) Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect. Immun.* v.82(12) p.5203- 5213.
- Riça-Capela, M.J.; Cortes, S.; Leandro, C.; Peleteiro, M.C.; Santos-Gomes, G.; Campino, L. (2003) Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res*, v.89 (3), p.163-169.
- Rivier, D.; Bovay, P.; Shah, R.; Didisheim, S.; Mael, J. (1999) Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunol*, v.21(9), p. 461–473.
- Roatt B.M.; Aguiar-Soares R.D.; Vitoriano-Souza J.; Coura-Vital W.; Braga S.L.; Corrêa-Oliveira R.; Martins-Filho O.A.; Teixeira-Carvalho A.; de Lana M.; Figueiredo-Gontijo N.; Marques M.J.; Giunchetti R.C.; Reis A.B. (2012) Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*.7(11):e49780.
- Roatt, B.M. (2010) Imunogenicidade e Eficácia da Vacina LBSap em Cães Após Desafio Intradérmico com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Extrato de Glândula Salivar de *Lutzomyia longipalpis*.(Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 131p.
- Roberts M.; Stober C.; Mckenzie A.; Blackwell J. (2005) Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* v.73(11): p 7620-8.
- Rodrigues, D. (2015) Imunogenicidade de três frações antigênicas de *Leishmania amazonensis* como candidatos vacinais avaliados em hamster contra leishmaniose visceral. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia). Ouro Preto, Universidade Federale de Ouro Preto. 64 p.

- Sacks D, Noben-Trauth N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev. Immunol* 2(11) p.845-858
- Sacks, D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.*, v.69(1), p.100-103.
- Sharma, S.K.; Dube, A.; Nadeem, A.; Khan, S.; Saleem, I.; Garg, R.; Mohammad, O. (2005) Non PC liposome entrapped promastigote antigens elicit parasite specific CD8+ and CD4+ T-cell immune response and protect hamsters against visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 24(11):1800-1810.
- Streit, J.A.; Recker, T.J.; Filho, F.G.; Beverley, S.M.; Wilson, M.E. (2001) Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *J Immunol*, v.166(3), p. 1921-1929.
- Swartz, M.A.; Hirose, S., (2012) Hubbell Engineering Approaches to Immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* v.4(148) p.148rv9.
- Symons, F.M.; Murray, P.J.; Ji, H.; Simpson, R.J.; Osborn, A.H.; Cappai, R. (1994) Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, v.67(1), p. 103-113.
- Tabbara, K.S.; Peters, N.C.; Afrin, F.; Mendez, S.; Bertholet, S.; Belkaid, Y. (2005) Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major*. *infection Infect Immun*, v.73(8), p. 4714–4722.
- Tafaghodi, M.; Eskandari, M.; Kharazizadeh, M.; Khamesipour, A.; Jaafari, M.R. (2010) Immunization against leishmaniasis by PLGA nanospheres loaded with an experimental autoclaved *Leishmania major* (ALM) and Quillaja saponins. *Trop Biomed*, 27 (3), p. 639–650.
- Titus, R.G.; Marchand, M.; Boon, T.; Louis, J.A. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* v.7(5) p.545-555.
- Tonui W.K.; Mpoke S.S.; Orago A.S.; Turco S.J.; Mbatia P.A.; Mkoji G.M. (2003) *Leishmania donovani*-derived lipophosphoglycan plus BCG induces a Th1 type immune response but does not protect Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and BALB/c mice against *Leishmania donovani*. *Onderstepoort J Vet Res.*;70(4) p.255-63.

- Travi, B.L.; Osorio, Y.; Melby, P.C.; Chandrasekar, B.; Arteaga, L.; Saravia, N.G. (2002) Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.* Infect Immun. v.70(5) p.2288–2296.
- Van Zandbergen, G.; Klinger, M.; Mueller, A.; Dannenberg, S.; Gebert, A.; Solbach, W.; Laskay, T. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J. Immunol. v.173(11), p. 6521–6525.
- Vasconcellos, R.C.; Urago, K.P.; Bunn-Moreno, M.M.; Madeira, E.D. (1996) Suppressor activity in *Leishmania donovani*-infected hamster serum: reversion by delipidated bovine serum albumin and role in cell cycle events. Braz J Med Biol Res. v.29(5), p.615–622.
- Vitoriano-Souza, J.; Moreira, N.; Teixeira-Carvalho, A.; Carneiro, C.M.; Siqueira, F.A.; Vieira, P.M.; Giunchetti, R.C.; Moura, S.A.; Fujiwara, R.T.; Melo, M.N.; Reis, A.B.(2012) Cell Recruitment and Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freud's Adjuvant and Monophosphoryl Lipid A. Plos One, v.7(7) p.40745.
- Weiser, M.G.; Thrall, M.A.; (2007) Quality control recommendations and procedures for in-clinic laboratories. Vet Clin North Am Small Anim Pract. v. 37(2) p.237-244.
- Wolford, S.T.; Schroer, R.A.; Gohs, F.X.; Gallo, P.P.; Brodeck, M.; Falk, H.B.; Ruhren, R. (1986) Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. J Toxicol Environ Health. v.18 (2), p.161-188.
- Wyllie, S.; Fairlamb, A.H. (2006) Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. Acta Trop. v.97(3), p.364–369.
- Zanin, F.H.; Coelho, E.A.; Tavares, C.A.; Marques-da-Silva, E.A.; Silva-Costa, M.M.; Rezende, S.A.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P. (2007) Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. Microbes and Infection, v.9(9), p.1070-1077.

10. Anexo

Certificado de aprovação na comissão de ética no uso de animais

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº. 385 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Análise dos níveis de proteção em plataforma de teste in vivo empregado-se novos candidatos vacinais contra Leishmaniose Visceral”, que tem como responsável Rodolfo Cordeiro Giunchetti, 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 11/03/2014. Este certificado espira-se em 11/03/2019.	
CERTIFICATE	
We hereby certify that the Protocol nº. 385 / 2013, related to the Project entitled “Analysis of the protection levels in vivo testing platform used to new vaccine candidates against visceral leishmaniasis”, under the supervision of Rodolfo Cordeiro Giunchetti, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/03/2014. This certificates expires in 11/03/2019.	
FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS	
Coordenador(a) da CEUA/UFMG	
Belo Horizonte, 11/03/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG	
https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	