

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**Ana Paula Barcelos Reinaque**

**Avaliação da segurança reprodutiva e da transmissão passiva de  
imunidade após processo de imunização com proteína  
peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis*  
durante a prenhez de ratas**

**Belo Horizonte - MG**

**2015**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**Avaliação da segurança reprodutiva e da transmissão passiva de  
imunidade após processo de imunização com proteína  
peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis*  
durante a prenhez de ratas**

Ana Paula Barcelos Reinaque

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Dr. Gustavo Tadeu Volpato

Co-Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

**Belo Horizonte - MG**

**Abril – 2015**

043

Reinaque, Ana Paula Barcelos.

Avaliação da segurança reprodutiva e da transmissão passiva de imunidade após processo de imunização com proteína peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis* durante a prenhez de ratas [manuscrito] / Ana Paula Barcelos Reinaque. – 2015.

77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Gustavo Tadeu Volpato. Co-orientador: Ricardo Toshio Fujiwara.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

À Deus, Santos, Anjos, Orixás... Ao Universo que conspirou comigo.

Aos meus pais Carlos Roberto Reínaque e Maria Aparecida Barcelos Reínaque, por fazerem de mim quem eu sou.

Ao meu imenso amor, Muryllo Mendes Possamai.

Aos meus filhos Lucca Veloso Rocha Possamai e Maria Júlia Reínaque Possamai, razão da intensa busca pelo crescimento. Que nossos esforços sejam vossos espelhos.

Aos meus sogros Ana Maria Mendes Possamai e Leonel Guido Possamai (*in memoriam*), pelo carinhoso apoio moral, material, e, principalmente espiritual.

Ao meu irmão Carlos Roberto Reínaque Jr, que mesmo sendo o caçula, é um grande exemplo para mim.

Aos meus queridos cunhados Aline, Leandro e Mariana, e à minha sobrinha Marina, pelo carinho de sempre.

## Agradecimentos

No meio de grande indecisão quanto ao meu futuro na Ciência, uma mão amiga me foi estendida e seu apoio incondicional redespertou em mim o amor pela pesquisa. Ganhei não só o melhor orientador, como também um grande parceiro, que quero preservar por toda a minha caminhada profissional e pessoal. Obrigada, professor Dr. Gustavo Tadeu Volpato! Pela paciência, orientação, amizade, disposição, incentivo, e conhecimento dispensados! Minha gratidão também à sua esposa e minha querida amiga Rosa Jacinto Volpato, por sempre ter uma palavra de carinho e otimismo, e por ser o doce de pessoa que é!

Ao meu co-orientador prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, e toda a sua equipe do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos - Ligp/Ufmg, que nos cederam as amostras da vacina utilizadas neste trabalho e contribuíram imensamente para a realização do mesmo;

A Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Federal de Mato Grosso e seus funcionários, por todo apoio prestado;

A Capes pelo apoio financeiro;

Pela colaboração e pelos ótimos momentos de convivência, agradeço a todos os colegas do laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva - FisiTox/UFMT. Tenho certeza que dali sairão grandes pesquisadores e, sobretudo, grandes seres humanos!

Um agradecimento especial à Rafaelanne Queiroz de Moraes Souza (Rafa), que participou efetivamente de todas as etapas desse trabalho, e é sem dúvida uma das pessoas mais dedicadas, prestativas e queridas que tive o prazer de conviver;

Aos professores Madilene F. Américo e Kleber Eduardo de Campos, pela amizade, presença, valiosas sugestões e pelos “deliciosos” cafés com adoçante que rendiam boas conversas!

Ao laboratório LeMat/Ufmt, especialmente ao querido amigo José Augusto Teixeira (Zé), que além de me ajudar nas adequações de pH, acrescentava serotonina no meu metabolismo, pois sempre me fez rir muito;

Por fim, aos professores, alunos e colaboradores do Programa de Doutorado Interinstitucional em Parasitologia e Imunologia UFMT-UFMG, em especial aos coordenadores Prof. Dr. Eduardo Luzia França e Profa. Dra. Érica Braga.

## **RESUMO**

A proteína peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis* conjugada ao adjuvante MPL (Monophosphoryl Lipid A) tem se mostrado um promissor candidato a vacina antileishmaniose. Apesar do potencial imunogênico do processo vacinal ser amplamente demonstrado para diferentes vacinas antiparasitárias, dados sobre a avaliação da segurança de proteínas recombinantes em formulações vacinais administradas durante o período gestacional, assim como informações sobre a transferência passiva de imunidade em animais vacinados durante a prenhez, são ainda escassos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a segurança vacinal quando da administração no período gestacional, com possíveis causas de prejuízos maternos ou fetais e avaliar a transferência passiva de imunidade para o recém-nascido de anticorpos reativos com a referida proteína, após processo de imunização em modelo experimental com ratos Wistar. Ratas em idade reprodutiva foram acasaladas e distribuídas em três grupos: **Controle** - ratas que receberam salina; **Adjuvante** - ratas que receberam adjuvante MPL, e **Vacina** - ratas que receberam a composição adjuvante mais a proteína peroxidoxina recombinante. A administração ocorreu por injeção subcutânea, na região dorsal, em três momentos (dias zero, sete e 14 de gestação). No 21º dia de prenhez, os animais foram anestesiados e mortos. Amostras de sangue materno e fetal foram coletadas para dosagem de anticorpos IgG anti-peroxidoxina por ELISA. O útero foi removido para se obter dados do desempenho reprodutivo e os fetos foram submetidos à análise de anomalias externas, esqueléticas e viscerais. Para avaliar a transferência de anticorpos via aleitamento, foi realizado um experimento de cross-fostering, onde ratas imunizadas e ratas controle tiveram seus filhotes por parto vaginal e as ninhadas foram trocadas para que recebessem amamentação adotiva. No 21º dia de lactação, os animais foram anestesiados e o sangue coletado para análise sorológica por ELISA. Houve um aumento na perda pós-implantação no grupo vacina (14,7%) em relação aos grupos controle (5,0%) e adjuvante (4,4%). Foi verificado um maior índice de anomalias viscerais em fetos provenientes do grupo Vacina. Com relação à sorologia, verificou-se que os níveis de imunoglobulina IgG anti-peroxidoxina foram superiores no grupo Vacina. Filhotes de ratas vacinadas também apresentaram níveis de IgG superiores àqueles provindos de ratas controle e adjuvante. A transferência de IgG anti-peroxidoxina permanece no período pós-natal, via aleitamento materno, e os índices de transferência de anticorpos via placenta ou amamentação são semelhantes. Esses dados permitem concluir que a imunização estimulou a produção da imunoglobulina IgG anti-peroxidoxina, sendo essa imunização transferida para feto via placenta e leite, mas a vacina aumentou as perdas pós-implantação e as anomalias fetais, mostrando que sua utilização durante a gravidez exige cuidado e maiores estudos.

**Palavras -chave:** peroxidoxina recombinante; leishmaniose, prenhez, malformações, imunidade.

## **ABSTRACT**

The peroxidoxin recombinant protein of *Leishmania braziliensis* associated with adjuvant MPL (Monophosphoryl Lipid A) has been shown to be a promising candidate for antileishmaniose vaccine. Although the immunogenic potential of the vaccine process is extensively shown for different anti-parasitic vaccines, data on the safety assessment of recombinant proteins in vaccine formulations administered during pregnancy, as well as information about the passive transfer of immunity in animals vaccinated during pregnancy are remain scarce. The objective of this study was to evaluate vaccine safety when the administration during pregnancy, with possible causes of maternal or fetal losses and evaluate the passive transfer of immunity to the newborn after immunization process in experimental model with Wistar rats. Rats in reproductive age were mated and allocated in three groups: **Control** - rats received saline; **Adjuvant** - rats received adjuvant MPL, and **Vaccine** - rats that received the composition adjuvant and peroxidoxin. The administration was by subcutaneous injection at the dorsal region, three times (days zero, seven and 14 of pregnancy). At day 21 of pregnancy the animals were anesthetized and blood collected for serological analysis by ELISA. There was an increase in post-implantation loss in the vaccine group (14.7%) compared to the control group (5.0%) and adjuvant (4.4%). It was verified a higher rate of visceral anomalies in fetuses from the vaccine group. Concerning to serology, it was found that levels of anti- peroxidoxin IgG were higher in the vaccine group. Offspring of vaccinated rats also showed higher IgG levels compared the offspring of rats control and adjuvant. The anti-IgG peroxidoxina transfer remains in the postnatal period, via breastfeeding, and transfer rates of antibodies through the placenta or breast-feeding are similar. These data showed that the immunization stimulated the production of IgG anti-peroxidoxin immunoglobulin, and this immunization transferred to the fetus through the placenta and milk, but the vaccine increased post-implantation loss and fetal anomalies, showing that its use during pregnancy requires care and further study.

**Key Words:** recombinant peroxidoxina; leishmaniasis, pregnancy, malformation, immunity

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>01</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>03</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>05</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>06</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>08</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>09</b>
3.1. LEISHMANIOSES.....	<b>09</b>
3.1.1. <i>Conceituação</i> .....	<b>09</b>
3.1.2. <i>Grupos e formas clínicas</i> .....	<b>10</b>
3.1.3. <i>Epidemiologia</i> .....	<b>12</b>
3.1.4. <i>Ciclo biológico</i> .....	<b>12</b>
3.1.5. <i>Resposta imunológica à infecção por Leishmania</i> .....	<b>14</b>
3.1.6. <i>Diagnóstico, Tratamento e Prevenção</i> .....	<b>17</b>
3.2. VACINAS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	<b>20</b>
3.2.1. <i>Importância dos adjuvantes no desenvolvimento de vacinas</i> .....	<b>21</b>
3.2.2. <i>Peroxidoxina</i> .....	<b>22</b>
3.3. TERATOGENESE.....	<b>24</b>
3.4. IMUNIZAÇÃO E GESTAÇÃO.....	<b>24</b>
3.4.1. <i>Transferência passiva de imunidade</i> .....	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. OBJETIVOS GERAIS.....	<b>29</b>
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>29</b>
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
5.1. ÉTICA.....	<b>30</b>
5.2. PRODUÇÃO DA PEROXIDOXINA RECOMBINANTE.....	<b>30</b>
5.2.1. <i>Expressão das proteínas recombinantes</i> .....	<b>30</b>
5.2.2. <i>Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade e gel filtração</i> .....	<b>30</b>
5.2.3. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE</i> .....	<b>31</b>
5.2.4. <i>Ensaio de dosagem das proteínas</i> .....	<b>31</b>
5.3. ANIMAIS.....	<b>32</b>
5.4. ACASALAMENTO.....	<b>32</b>
5.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	<b>33</b>
5.6. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	<b>34</b>

5.7. DADOS DA PRENHEZ.....	34
5.7.1. Toxicidade aguda das progenitoras.....	34
5.7.2. Avaliação da performance reprodutiva.....	34
5.7.3 - Resultados placentários e fetais.....	35
5.7.4 - Teratogenicidade .....	35
5.7.4.1 – Análise das Anomalias Externas.....	35
5.7.4.2. – Análise das Anomalias Viscerais .....	36
5.7.4.3. – Análise das Anomalias Esqueléticas .....	36
5.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.....	37
5.8.1. Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgG anti-peroxidoxina	37
5.8.2. Avaliação da Imunização transplacentária.....	38
5.8.3. Avaliação da Imunização pelo leite materno.....	38
5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
6.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PEROXIDOXINA RECOMBINANTE.....	40
6.2. DADOS MATERNOS.....	41
6.3. DADOS FETAIS.....	42
6.3.1. Resultados placentários e fetais.....	42
6.3.2. Centros de ossificação fetais.....	42
6.3.3. Incidência de anomalias fetais.....	43
6.4. DADOS IMUNOLÓGICOS.....	46
6.4.1. Detecção de anticorpos maternos reativos a peroxidoxina.....	46
6.4.2. Persistência dos níveis de IgG anti-peroxidoxina materna.....	47
6.4.3. Transferência de imunidade via placenta.....	48
6.4.4. Transferência de imunidade via aleitamento.....	49
6.4.5. Índice de Transferência de Imunidade.....	50
6.4.6 Titulação de IgG.....	51
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>61</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>62</b>
<b>11. ANEXO - Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMT).....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

**•OH:** hidroxila

**AIP:** Adequado para idade de prenhez

**ANOVA:** Analysis of variance

**APC:** célula apresentadora de antígeno

**BCA:** ácido biciconínico

**Células NK:** células natural killer

**CEPA:** Comitê de Ética em Pesquisa Animal

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**CpG ODN:** Oligodesoxinucleótidos CpG-desoxinucleotideo trifosfato de citosina ("C"), seguido por um desoxinucleotídeo trifosfato de guanina ("G"). O "p" refere-se à ligação fosfodiéster entre eles

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DP:** Desvio padrão

**DO:** Densidade Óptica

**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay

**Fe<sup>2+</sup>:** íon ferro II

**GIP:** Grande para a idade de prenhez

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HLA:** Human Leukocyte Antigen

**IFN-γ:** interferon gama

**IgA:** Imunoglobulina A

**IgG:** Imunoglobulina G

**IgM:** Imunoglobulina M

**IL:** interleucina

**INPI:** Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**IPTG:** Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

**kDA:** kilodalton

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**M:** molar

**MHC:** Major histocompatibility complex

**mL:** mililitro  
**mM:** milimolar  
**NaCl:** Cloreto de sódio  
**ng :** nanograma  
**NO<sup>•</sup> :**monóxido de nitrogênio  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** ânion superóxido  
**O<sub>2</sub>:** Oxigênio molecular  
**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito  
**PAGE:** Polyacrylamide gel electrophoresis  
**PBS:** Phosphate buffered saline  
**PBST -** Phosphate buffered saline + Tween 20  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PFAM:** Protein Families Database  
**pg:** picograma  
**pH:** potencial hidrogeniônico  
**PIP:** Pequeno para Idade de Prenhez  
**PSI-BLAST:** Position-Specific Iterated- Basic Local Alignment Search Tool  
**q.s.p.:** Quantidade Suficiente Para  
**RNA:** ácido ribonucleic  
**rpm:** rotações por minuto  
**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate  
**SFM:** Sistema Fagocítico Mononuclear  
**SOD:** Superóxido dismutase  
**T CD4<sup>+</sup>:** Linfócito T helper que expressa a proteína de superfície CD4  
**T CD8<sup>+</sup>:** Linfócito T helper que expressa a proteína de superfície CD8  
**TAE:** tampão Tris-Acetato-EDTA  
**TEMED:** Tetramethylethylenediamine  
**Th-1 :** linfócito T helper 1  
**Th-2 :** linfócito T helper 2  
**TLR:** Toll-like receptor  
**TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alfa  
**TRIS-HCL:** Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride  
**UI:** Unidade individual

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Ciclo biológico do parasita *Leishmania*.....14
- Figura 02.** Respostas imunológicas associadas ao controle ou progressão da Leishmaniose.....16
- Figura 03.** Reações Celulares que culminam na produção de intermediários de O<sub>2</sub> altamente reativos.....23
- Figura 04. A:** *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. **B:** Bioério do Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FisioTox). **C:** Gaiolas coletivas com capacidade máxima de quatro animais.....32
- Figura 05.** Lâmina de esfregaço vaginal com células queratinizadas (fase estro do ciclo estral) e espermatozoides.....33
- Figura 06.** Imunização por via subcutânea, na região dorsal .....34
- Figura 07.** Análise de anomalias fetais externas.....35
- Figura 08.** Processamento fetal para análise de anomalias viscerais. Cortes seriados de Wilson.....36
- Figura 09.** Processamento fetal para análise de anomalias esqueléticas.....37
- Figura 10.** Expressão e purificação da proteína peroxidoxina recombinante, separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com Coomassie Blue.....40
- Figura 11.** Porcentagem de perdas pré e pós-implantação de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....41
- Figura 12. A:** Ossificação incompleta do esternébrio. **B:** Esternébrios assimétricos **C:** Cálice

renal dilatado, uma das alterações necessárias para constatação de hidronefrose..... 45

**Figura 13.** Detecção de de IgG anti-peroxidoxina em ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....46

**Figura 14.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina em ratas que receberam salina (Controle) ou Vacina nos dias 0 e 21 de lactação.....47

**Figura 15.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina materna e fetal de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....48

**Figura 16.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina materna e fetal no dia 21 de lactação de ratas que receberam salina (Controle) ou Vacina durante a prenhez.....49

**Figura 17.** Porcentagem da taxa de transferência passiva de anticorpos IgG anti-peroxidoxina via placenta e leite de ratas que receberam Vacina durante a prenhez.....50

**Figura 18.** Titulação de IgG anti-peroxidoxina de ratas que receberam Vacina durante a prenhez e em seus filhotes.....51

## LISTA DE TABELAS

**Tabela I.** Dados dos pesos dos fetos e placentas de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....42

**Tabela II.** Médias e respectivos desvios-padrão dos centros de ossificação de fetos de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....43

**Tabela III.** Frequência de anomalias em fetos de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.....44

## **1. INTRODUÇÃO**

O sistema imunológico dos mamíferos recém-nascidos é, caracteristicamente, pouco desenvolvido (LEWIS e WILSON, 2006). Antes da maturidade imunológica, estes animais seriam muito susceptíveis às diversas infecções se não pudessem contar com a defesa dos anticorpos recebidos passivamente da circulação materna através da membrana placentária ou da glândula mamária através do colostro (MARÓDI, 2006). Por outro lado, sabe-se que a imunidade passiva tem duração limitada, tendo sido verificado que ela é evidenciável por um período relativamente curto, ao passo que a imunidade ativamente induzida pela vacinação é, em muitos casos, mais duradoura (FURUTA *et al.*, 1982).

Embora as vacinas sejam desenvolvidas para proteger os animais contra um amplo número de patógenos importantes, algumas vezes elas são apenas parcialmente efetivas, seja pela sua ineficiência em gerar uma resposta imune adequada, seja pela possibilidade de transmitir doenças (ELLIS, 2004). Uma vacina ideal deve apresentar as seguintes características: prevenir a doença, proteger contra as diferentes cepas, induzir imunidade de longa duração, ser livre de antígenos contaminantes, conservar a potência durante o armazenamento e transporte e ser de fácil administração (DE VOS & BOCK, 2000; COLER, 2005).

Neste sentido, há um interesse crescente pelo uso da biotecnologia no campo da medicina preventiva, diagnóstico e controle. Nas últimas décadas, o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas de imunologia e biologia molecular, lançou as bases para os avanços na tecnologia de produção de vacinas, permitindo a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune (ADA e RAMSHAW, 2003).

Dentre as novas abordagens, encontram-se vacinas confeccionadas a partir de seqüências de aminoácidos de proteínas que são sintetizadas em laboratório (vacinas de peptídeos sintéticos), vacinas com proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Nos três modelos de vacinação citados, a escolha dos epítomos é fundamental. É necessário que os peptídeos sejam naturalmente apresentados ao linfócito T durante a infecção; que sejam reconhecidos por praticamente 100% dos indivíduos e que induzam resposta imune adequada. O principal evento no desencadeamento da resposta imune é o reconhecimento do antígeno pelo receptor *ab* do linfócito T ligado às moléculas HLA de classe I ou II. Atualmente, existem programas computacionais baseados em algoritmos que indicam a

capacidade de ligação de determinados peptídeos a determinadas moléculas HLA, permitindo a escolha de segmentos com maiores chances de serem reconhecidos pela maioria dos indivíduos, no caso de escolha para uma vacina (CUNHA-NETO, 1999; DUTHIE *et al.*, 2012).

Especificamente no caso de vacinas recombinantes, a partir da identificação de proteínas imunogênicas de um determinado agente patógeno, é possível identificar as seqüências de nucleotídeos que compõem estas proteínas em um banco de dados e produzi-las em grandes quantidades, expressando seus genes em sistemas heterólogos e posteriormente testar, por imunização ativa, o potencial imunoprotetor de cada uma destas proteínas (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na produção novos imunobiológicos antileishmania (CARDOSO *et al.*, 2003; FUJIWARA *et al.*, 2005; MIRET *et al.*, 2008; GIUNCHETTI *et al.*, 2008). Dentre eles, destaca-se a proteína peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis*, utilizada no presente trabalho, e que, conjugada ao adjuvante MPL (Monophosphoryl Lipid A) tem se mostrado um promissor candidato a vacina anti-leishmaniose (Patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI - sob o número de registro: PI1020120300664 em 11/2012).

Apesar do potencial imunogênico do processo vacinal ser amplamente demonstrado para diferentes vacinas, estudos que determinam a segurança do processo de imunização, sobretudo em gestantes, são escassos (PIMENTEL *et al.*, 2010). No Brasil, a edição mais atual do Manual de Normas de Vacinação do Ministério da Saúde especifica que a administração de vacinas de vírus inativados ou de bactérias mortas, toxóides e de vacinas constituídas por componentes de agentes infecciosos não acarreta qualquer risco para o feto. Já as vacinas vivas são contra-indicadas em gestantes (BRASIL, 2001).

Sendo assim, ainda não existem recomendações específicas para a administração dos imunobiológicos provenientes da tecnologia recombinante durante a gestação. Além disso, poucos são os estudos que determinam o potencial de transferência passiva de anticorpos em neonatos. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar se a peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis* administrada no período gestacional é segura para o embrião e avaliar a transferência passiva para o recém-nascido de anticorpos reativos com a referida proteína através da passagem transplacentária e do aleitamento materno, respectivamente.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Poucos são os estudos randomizados e controlados que visam aferir a segurança de vacinas para uso em gestantes. No caso de seres humanos, muito da experiência da utilização de vacinas em gestantes advém do uso inadvertido desses imunobiológicos durante esse período. O Ministério da Saúde preconiza que as vacinas que contém componentes vivos devem ser evitadas durante a gestação, pelo risco teórico de infecção fetal pelo antígeno vacinal, com eventual interferência na embriogênese e desenvolvimento do feto, enquanto vacinas inativas são seguras e podem ser utilizadas (SUCCI e FARHAT, 2006).

Por se tratar de uma tecnologia atual e com poucas substâncias liberadas para utilização em humanos ou animais, a literatura não fornece dados sobre a avaliação da segurança de vacinas produzidas com proteínas recombinantes administradas durante o período gestacional, assim como informações acerca da transferência passiva da imunidade conferida por elas.

Considerando que os animais neonatos apresentam imaturidade do sistema imunológico e que os mesmos estão expostos aos diversos patógenos desde o nascimento, estudos que verifiquem a eficiência da imunização ativa durante a prenhez e a imunidade transferida ao recém-nascido como saldo deste procedimento pode representar inúmeras vantagens no setor econômico, médico e científico.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. LEISHMANIOSES**

##### **3.1.1. Conceituação**

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários incluídos na ordem Kinetoplastida, na família Trypanosomatidae e no gênero *Leishmania*. Estes protozoários são seres unicelulares e possuem ciclo biológico heteróxico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado, representado por canídeos silvestres e domésticos, além de roedores e humanos, e de um invertebrado, representado pelo inseto vetor (SCHLEIN, 1993), no caso flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo e ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo (MACHADO-COELHO *et al.*, 1999). A principal forma de aquisição da doença é através da picada do flebotomíneo. Todavia, a transmissão pode ser também transfusional e vertical (GENARO, 2000; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004) esta última, por meio da passagem de formas amastigotas pela placenta durante o período gestacional (MEINECKE *et al.*, 1999; BOEHME *et al.*, 2006). Outras formas de transmissão menos frequentes incluem acidentes de laboratório com objetos contaminados e compartilhamento de seringas entre usuários de drogas, sendo esta encontrada como principal forma de transmissão nos casos de leishmanioses em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (FIGUERÓ-FILHO *et al.*, 2005).

Os primeiros casos de leishmaniose humana aconteceram na Índia no ano de 1885 e, somente alguns anos mais tarde, em 1903, é que o agente causador desta enfermidade foi descoberto e descrito por William Boog Leishman e Charles Donovan (PESSOA & MARTINS, 1988; REY, 2001). A epidemiologia da doença é hoje extremamente diversificada com vinte espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem e trinta espécies de inseto vetor. O parasito é encontrado nas formas promastigota e paramastigota, ambas apresentando flagelo, no trato gastrointestinal dos flebotomíneos (hospedeiros invertebrados) e na forma amastigota, sem flagelo livre, dentro das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados (RYAN *et al.*, 1987; BRANDONISIO *et al.*, 2000; BAYELE *et al.*, 2007).

As leishmanioses se caracterizam por dois ciclos epidemiológicos principais, o zoonótico, onde o animal reservatório está envolvido na transmissão e, o antroponótico, onde o homem é o reservatório e a fonte de infecção do vetor (LAINSON, 1983; ROGERS, 1988). Sendo assim, o ciclo zoonótico apresenta, como principais reservatórios,

animais vertebrados como a preguiça, o cão doméstico, os ratos, o gerbil e a paca, dentre outros (ASHFORD, 1996).

A leishmaniose é uma doença que pode apresentar várias formas clínicas, dependendo da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro (BRASIL, 2006; 2007). Atualmente, o número de pacientes com leishmaniose aumenta de maneira alarmante e incontrolada, devido a diversos fatores como a inexistência de uma vacina, a ineficácia do tratamento, a aparição de resistência aos fármacos disponíveis, e a expansão do parasito devido às mudanças climáticas, as migrações e a globalização (SHAW, 2007; KEDZIERSKI *et al.*, 2010).

### **3.1.2. Leishmanioses: Grupos e formas clínicas**

As leishmanioses são classificadas em dois grupos clínicos de acordo com o acometimento dos órgãos, sendo que a Leishmaniose Tegumentar (LT) acomete pele e mucosas, e a Leishmaniose Visceral (LV) acomete vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea e, ainda, linfonodos (TAVARES *et al.*, 2009).

A LT pode apresentar-se em três formas principais. 1) A forma cutânea localizada apresenta como lesão típica úlcera indolor, de bordo elevado e fundo granuloso, podendo ser única ou múltipla. 2) A cutaneomucosa caracteriza-se por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões naso-faríngeas e resulta da extensão direta ou de metástase hematogênica de lesão cutânea primária. 3) Na cutânea difusa há presença de lesões nodulares não-ulceradas, precedidas por úlcera única que evolui com disseminação linfática do parasito. Esta forma está associada a uma resposta imune celular deprimida que leva o paciente a um estado de anergia imunológica (PETERS, 1993; WEIGLE e SARAVIA, 1996; ASHFORD, 2000; BRASIL, 2006; MURBACK *et al.*, 2011).

MORGAN *et al.* (2007) relatam que a leishmaniose tegumentar durante a gravidez é caracterizada por lesões mais graves e com uma aparência altamente atípica, e pode aumentar o risco de complicações fetais. Os autores afirmam ainda que as terapias disponíveis não são indicadas durante a gestação, devido a falta de estudos consistentes que definam um padrão para a terapêutica de forma mais segura e eficaz, uma vez que os fármacos disponíveis não são seguros para tratamento no período gestacional.

No Brasil, sete espécies de *Leishmania* causadoras da LT foram identificadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (L) amazonensis* e, mais recentemente, as

espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Visceral, ou Calazar, é uma doença sistêmica grave que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e animais, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele. Possui amplo espectro epidemiológico com distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina ela está presente em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (BRASIL, 2006).

As três principais espécies causadoras da LV são a *Leishmania (L.) donovani*, presente no continente asiático, *Leishmania (L.) infantum*, presente na Europa e África e *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas. A *L. donovani* é responsável pela infecção em humanos, enquanto que a *L. infantum* e a *L. chagasi* causam a LV tanto em humanos quanto em cães. A *L.(L.) chagasi* responsabilizada pela doença nas Américas é considerada por alguns autores espécie semelhante a *L.(L.) infantum*. Assim, respeitando regras de prioridade o nome *L. chagasi* seria sinônimo de *L. infantum* (BRASIL, 2006).

Em ambientes naturais, animais silvestres como preguiças, raposas, gambás, ratos, gerbil e pacas, dentre outros são os principais reservatórios do protozoário e fontes de infecção para os vetores. Porém, nos centros urbanos a transmissão se torna potencialmente perigosa devido ao grande número de cães domésticos, que além de atuarem como reservatórios, ainda desenvolvem um quadro clínico semelhante ao do homem (ASHFORD, 1996).

A LV é caracterizada clinicamente pela manifestação de febre irregular, esplenomegalia e anemia, e quando não tratada, pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos. As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores associados à morte, visto que o hospedeiro não tem uma resposta protetora eficiente contra o parasito (ASHFORD, 2000).

O primeiro caso relatado de LV em gestante foi descrito por Low e Cooke, na África em 1926, com seu recém-nascido apresentando sinais e sintomas de LV, confirmado posteriormente como sendo de transmissão vertical. Em 1955, outro caso foi relatado na Inglaterra, de gestante que tinha residido na Índia, também com a criança tendo manifestações clínicas e confirmação laboratorial no sétimo mês de vida (CALDAS *et al.*, 2003) Em 1999, Meinecke *et al.* chamaram a atenção por relatar um caso de transmissão congênita de LV, estando a gestante assintomática. Neste caso, a criança passou a apresentar sinais e sintomas compatíveis com o calazar com 16 meses de vida,

sendo que nunca tinha estado em região endêmica e não havia vetores onde residia. Contudo, sua mãe esteve em países do Mediterrâneo, endêmicos de LV, sem no entanto ter apresentado manifestações clínicas, todavia apresentava sorologia e teste de Montenegro positivos

No Brasil, principalmente em áreas urbanas e periurbanas, o aparecimento de calazar entre gestantes começa a tornar-se mais freqüente (CALDAS *et al.*, 2003). O primeiro caso foi relatado em 1993 e seqüencialmente, outros casos foram relatados (Moraes *et al.*, 1995; Viana *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2003; Caldas *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2007; Figueiró-Filho *et al.*, 2008).

Ainda existe discussão quanto à toxicidade das drogas utilizadas para o tratamento do calazar durante a gestação, e os medicamentos disponíveis não são considerados seguros para o uso durante a gravidez. Todavia, o risco materno-fetal é elevado nos casos de LV durante a gestação, aumentando a morbimortalidade materna e fetal, sem a instituição de terapêutica adequada (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004; 2005). Desse modo, apesar de não haver concordância sobre a segurança dos medicamentos antileishmânia na gravidez, o tratamento de gestantes com LV está indicado, uma vez que o risco de mortalidade materna e fetal em situações de não tratamento específico pode atingir índices próximos a 90% (YADAV *et al.*, 1989; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004).

### **3.1.3 Epidemiologia**

A leishmaniose é a segunda mais importante protozoose do mundo, está entre as seis endemias de maior relevância e cerca de 350 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença em 88 países, sendo 72 destes em desenvolvimento. Atualmente, mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas e a cada ano ocorrem aproximadamente 2 milhões de novos casos em todo mundo (DESJEUX, 2004; WHO, 2012).

No Brasil, foram notificados, no período de 1990 a 2011, 561.673 casos de leishmanioses, sendo 508.193 (90,5%) casos pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* e 53.480 (9,5%) pela *L. (L.) infantum chagasi* (KASHINO *et al.*, 2012).

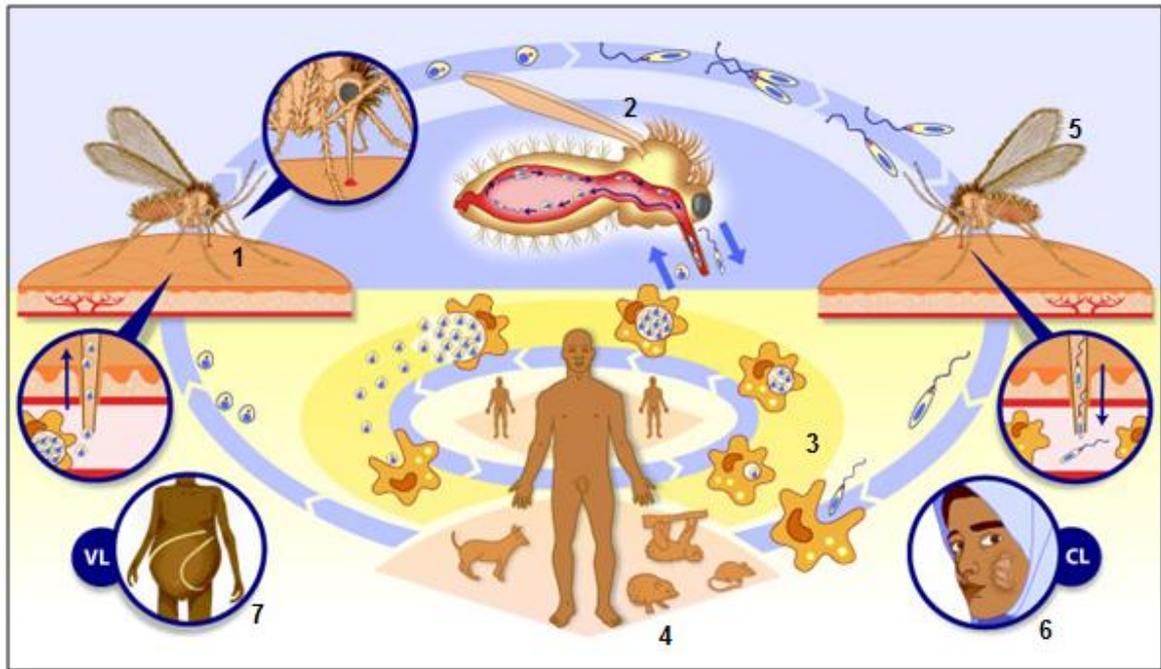
### **3.1.4 Ciclo biológico**

Os parasitos podem se apresentar em três diferentes formas no ciclo biológico, a amastigota, a promastigota e a paramastigota. A forma amastigota tem característica ovóide ou esférica, uninucleada, com cinetoplasto em forma de bastão e com ausência de

flagelo livre. A forma promastigota já se apresenta com formato alongado e pequeno, é uninucleada, flagelada e possui cinetoplasto ovóide localizado na região anterior enquanto a forma paramastigota possui formato achatado, sendo também flagelada, uninucleada e com cinetoplasto próximo ao núcleo (LAWYER *et al.*, 1990).

O ciclo biológico (Figura 01) tem seu início quando a fêmea do inseto vetor pica um animal vertebrado infectado e, durante o repasto, adquire formas amastigotas que parasitam principalmente macrófagos presentes no sangue ingerido. Entre 15 e 221 horas após a picada, as formas de *Leishmania* já estão presentes no intestino médio do inseto vetor (LAINSON e SHAW, 1988; ROGERS e BATES, 2007).

No lúmen intestinal do inseto, ocorre o rompimento destes macrófagos, liberando as formas amastigotas que se dividem por divisão binária e se transformam em promastigotas procíclicas, dentro da membrana peritrófica. Estas formas se dividem rapidamente, fazendo com que a membrana peritrófica se rompa, permitindo que a *Leishmania* colonize o trato digestivo posterior, médio e anterior do flebotomíneo. Após isso, se transformam em promastigotas procíclicas que, posteriormente, se diferenciam em promastigotas metacíclicas, as formas infectantes do parasito (LAINSON e SHAW, 1988). Em novo repasto, as formas promastigotas metacíclicas presentes no trato digestivo anterior, probóscida, faringe e esôfago, são transmitidas pelo flebotomíneo a um hospedeiro não infectado, através da possível regurgitação do inseto causada pelo bloqueio da válvula proventricular, devido ao intenso parasitismo no intestino anterior. No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos, onde, dentro do vacúolo fagocitário, sofrem diferenciação para formas amastigotas. Este vacúolo fagocitário se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo onde as formas amastigotas sofrem várias divisões binárias até que, pelo excesso de parasitismo, as células se rompem ou realizam exocitose (RITTIG e BOGDAN, 2000), liberando as formas amastigotas que podem, assim, parasitar novos macrófagos e serem transmitidas a outro flebotomíneo durante nova picada (MURRAY *et al.*, 2005; STUART *et al.*, 2008).



**Figura 01.** Ciclo biológico do parasita *Leishmania*. 1- Macrófagos infectados podem ser ingeridos por insetos vetores durante o repasto. 2- No intestino do inseto vetor as formas amastigotas até promastigotas metacíclicas que migram para a porção anterior do intestino e são transmitidas durante a picada do inseto. 3- Fagocitose das formas promastigotas que podem infectar outros macrófagos. 4- Hospedeiros vertebrados. 5- Hospedeiros invertebrados (inseto vetor fêmea do gênero *Lutzomyia* em países do Novo Mundo e do gênero *Phlebotomo* em países do Velho Mundo). 6- Manifestação clínica da leishmaniose tegumentar. 7- Manifestação clínica da leishmaniose visceral. <http://www.who.int/trd/publications/documents/leishmaniasis-life-cycle>.

### 3.1.5. Resposta imunológica à infecção por *Leishmania*

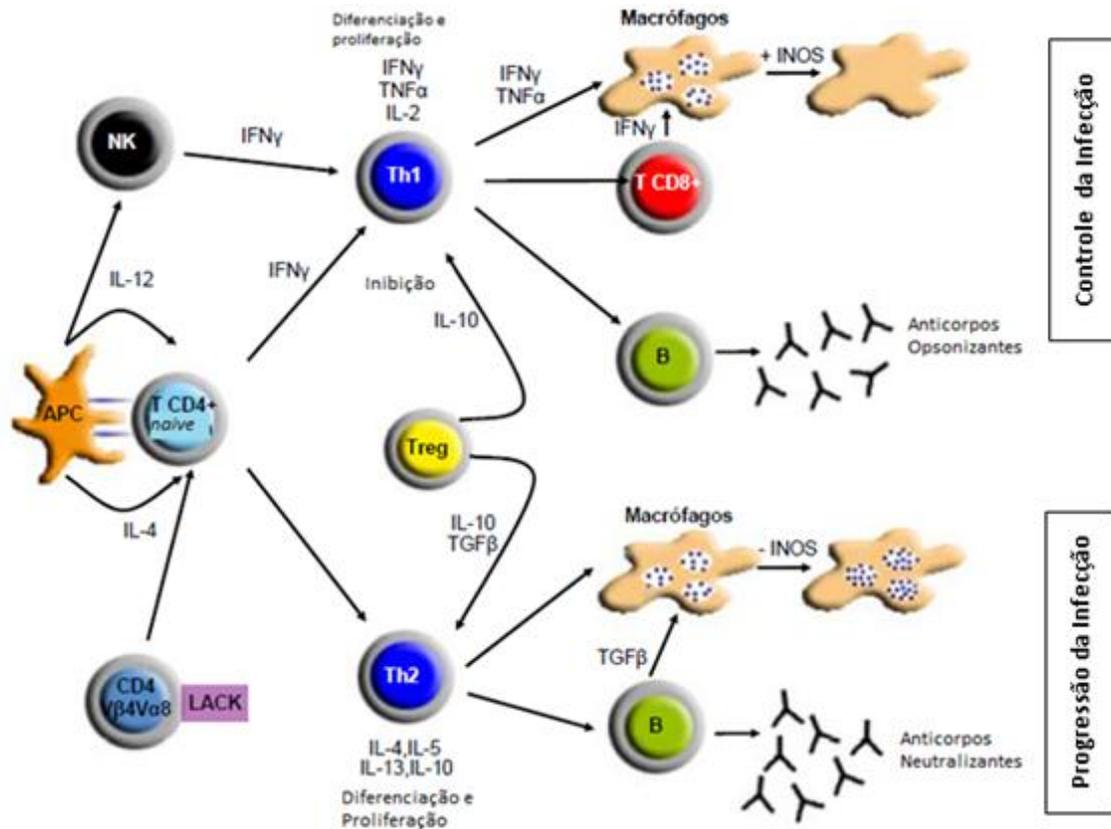
O hospedeiro imunocompetente é capaz de ativar as respostas inflamatórias inata e adquirida que vão estabelecer o grau de expressão da doença (Figura 02). Primeiramente, os macrófagos são ativados a um estado leishmanicida estimulado por uma resposta de células T auxiliares do tipo 1 (Th1). Esta resposta envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs), células T CD4<sup>+</sup> e uma grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina- 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta mesma resposta Th1 previne a manifestação da doença após um estado latente e o estabelecimento de fase crônica (STOBIE *et al.*, 2000).

No sítio da infecção, uma resposta inata complexa inclui múltiplos fatores, como a presença de células (neutrófilos, monócitos/macrófagos, células “*Natural Killer*” (NK) e células dendríticas), mecanismos de reconhecimento de receptores (receptores “*toll-like*”) e mecanismos do sistema complemento e liberação de citocinas, em especial a IL-12 que auxilia na indução de imunidade mediada por células. Este complexo conjunto de mecanismos, em grande parte iniciado por células dendríticas infectadas, tem sua continuação com a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A migração destas células T efetoras para o local da picada se dá, tanto na leishmaniose tegumentar como na visceral, com a participação de moléculas de adesão e de quimiocinas. A partir daí, a resposta de células T CD4<sup>+</sup> está associada à produção de IFN- $\gamma$  e de outras citocinas como a IL-12, a IL-2 e o TNF- $\alpha$ . As células T CD8<sup>+</sup> apresentam papel importante por produzirem IFN- $\gamma$  e promoverem o maior desenvolvimento de células T CD4<sup>+</sup>, auxiliando no alcance da cura da doença (STOBIE *et al.*, 2000; MURRAY *et al.*, 2005).

Ao longo do desenvolvimento destes vários mecanismos na leishmaniose, são produzidas também citocinas reguladoras que agem balanceando a resposta imunológica. A IL-4, a IL-10 e a IL-13 são citocinas associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta do tipo 1, inibindo macrófagos e, assim, favorecendo a infecção intracelular. A ausência da IL-10 favorece a ativação da resposta do tipo 1, promovendo a eliminação do parasito e um sinergismo da resposta imunológica com a quimioterapia em infecções agudas (MURRAY *et al.*, 2002).

No sítio da infecção, há migração de neutrófilos que iniciam a fagocitose dos parasitos. Uma vez interiorizados, se inicia um processo de eliminação do parasito pelas enzimas proteolíticas e por espécies reativas de oxigênio produzidas no interior dos lisossomos que se fundem com os fagossomos formando os fagolisossomos. Neste processo, ocorre ainda a produção de IL-8, essencial para a atração de novos neutrófilos. Da mesma forma, macrófagos são atraídos ao local da infecção, fagocitam o parasito e iniciam a produção de citocinas como TNF- $\gamma$ , IL-6, IL-18 e IL-12 e de metabólitos tóxicos do oxigênio, como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico. A IL-12 e a IL-18 são citocinas que auxiliam na ativação de Th1, principalmente quando atuam em sinergismo. Mecanismos como a explosão respiratória (produção de intermediários reativos do oxigênio) e a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são importantes para a eliminação dos parasitos pelos macrófagos (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998;

STAFFORD *et al.*, 2002). Em humanos, o principal mecanismo de eliminação da *Leishmania* por estas células resulta da ação de radicais de oxigênio e de óxido nítrico (MOSSALAYI *et al.*, 1999).



**Figura 02.** Respostas imunológicas associadas ao controle ou progressão da leishmaniose

As células dendríticas, por sua vez, são potentes células apresentadoras de antígeno que induzem uma eficiente ativação de células T e produzem também citocinas como IL-12, IL-10 e IFN-γ. A IL-12 produzida tem grande importância no controle de infecções por *Leishmania* (MATTNER *et al.*, 1997a,b). Embora o macrófago também seja capaz de produzir IL-12 diante da infecção pelo parasita, as células dendríticas são a principal fonte desta citocina e estas células são ainda essenciais para a manutenção de número suficiente de células Th1 de memória ou efetoras *in vivo* para mediar proteção prolongada contra *Leishmania* (STOBIE *et al.*, 2000).

### **3.1.6. Diagnóstico, Tratamento e Prevenção das Leishmanioses**

Diversas são as técnicas sorológicas e parasitológicas que podem auxiliar no diagnóstico das Leishmanioses, no entanto, se faz necessário a associação de duas ou mais técnicas para assegurar o resultado acurado e preciso (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Na presença de lesões típicas de Leishmaniose Tegumentar, o diagnóstico deve ser realizado pelo histórico do paciente, exame dermatológico e pela positividade de pelo menos, dois exames diagnósticos específicos. Deve ser realizada pesquisa de amastigotas em esfregaço, cultura para *Leishmania*, exame histopatológico das lesões, identificação de *Leishmania* por reação em cadeia de polimerase (PCR) e anticorpos monoclonais (SAMPAIO *et al.*, 2009). Os métodos para detecção de anticorpos circulantes mais utilizados no diagnóstico da LT são: imunofluorescência indireta (IFI), imunoenzimáticos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e immunoblotting, além de testes de aglutinação direta e citometria de fluxo (TANNÚS *et al.*, 2007).

O diagnóstico da leishmaniose visceral é complexo porque outras doenças como a malária, febre tifoide, tuberculose, dentre outras, podem compartilhar suas características clínicas e estar presentes juntamente com a LV, havendo uma co-infecção. Além disto, a localização do parasito no baço, fígado, medula óssea e linfonodos dificulta o diagnóstico parasitológico direto (SINGH *et al.*, 2006). O padrão ouro para o diagnóstico é a demonstração do parasito (forma amastigota) em biópsia de tecido, porém, este procedimento necessita ser feito por um médico em um ambiente hospitalar e pode oferecer riscos ao paciente por ser um método invasivo (SUNDAR e RAI, 2002).

O diagnóstico molecular possibilita a detecção do DNA do parasito mediante reação de PCR usando-se diversas amostras biológicas, tais como sangue e aspirado de medula. O diagnóstico sorológico é favorecido pela expressiva resposta imune humoral que caracteriza a doença. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 (DUXBURY e SADUN, 1964) e é o teste atualmente disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). São também utilizados os métodos imunoenzimáticos que empregam grande variedade de antígenos e o teste de aglutinação direta (DAT), um dos testes mais simples e de baixo custo já desenvolvidos para o diagnóstico da LV, tendo sido validado em diversas áreas endêmicas (ASSIS *et al.*, 2008).

As opções de tratamento para as leishmanioses são limitadas e estão longe de serem satisfatórias. Todos os fármacos disponíveis devem ser administrados durante um longo

período de tempo, além de serem potencialmente tóxicos. A droga de primeira escolha no Brasil e no Mundo para o tratamento humano é o antimonial pentavalente, na forma de antimoniato de N-metilglucamina ( $Sb5^+$ ). O principal efeito colateral do  $Sb5^+$  é decorrente da sua ação no aparelho cardiovascular e outras reações adversas também são observadas como insuficiência renal aguda, icterícia e pancreatite (BRASIL, 2006). Em nosso país o tratamento com  $Sb5^+$  tem alcançado um bom índice de cura e existem poucos relatos de resistência. Entretanto, na Índia vem se observando uma grande resistência dos parasitos aos compostos de antimoniais (SINGH *et al.*, 2006).

Anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida, é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. Considerada mais eficaz que os antimoniais no tratamento das lesões mucosas (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Anfotericina B lipossomal, trata-se de uma nova formulação em que a anfotericina B e incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B (BRASIL, 2006; 2007).

As pentamidinas são diamidinas aromáticas que vem sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (BRASIL, 2006; 2007).

Para conter o avanço da doença, as medidas de controle são imprescindíveis. O principal objetivo é interromper a cadeia de transmissão do parasito através de um tripé de ações que incluem o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, eliminação do inseto vetor através de inseticidas piretróides de ação residual e eutanásia de cães que apresentam sorologia positiva (TESH, 1995; BRASIL, 2006). Cães domésticos exercem importante papel na manutenção do parasito, e os casos de leishmanioses caninas precedem a ocorrência de casos humanos. É importante salientar que a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (CHAGAS *et al.*, 1937; DEANE, 1955; ALMEIDA-SILVA, 2002).

Um fator importante associado a dificuldade de eliminação do reservatório do parasito é o impacto social e emocional que a prática da eutanásia de cães soropositivos causa em seus donos, que muitas vezes os consideram como parte da família (Dantas-TORRES, 2006). É comum em áreas endêmicas, a prática terapêutica da Leishmaniose canina como rotina nas clínicas veterinárias. Estes tratamentos, quando realizados com produtos de uso humano, são proibidos pelo Ministério da Saúde de acordo com a portaria

interministerial do Ministério da Saúde (nº1.426, de 11 de julho de 2008), pois colocam em risco os programas de controle da doença, expondo a população humana e canina ao risco de infecção. Até o momento não existe no mercado esquema terapêutico que seja capaz de promover a cura parasitológica em cães. Assim, diferentes estudos demonstram que estes animais podem até apresentar melhora clínica, mas o parasitismo na pele persiste e este cão continua sendo fonte de transmissão do parasito para o flebotomíneo. Além disso, é importante mencionar que este tratamento pode também selecionar cepas resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento humano (NEOGY *et al.*, 1994; NOLI e AUXILIA, 2005; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; PASA *et al.*, 2005; VOULDOUKIS *et al.*, 2006; BRASIL, 2006).

Desta forma, a melhor alternativa para combater a crescente expansão da doença seria o desenvolvimento de vacinas anti-leishmaniose, tanto no âmbito da saúde humana como na saúde veterinária, contribuindo de forma efetiva nos programas de controle do Ministério da Saúde. Até o momento ainda não há uma vacina humana comprovadamente eficaz para ser recomendada pelo Ministério da Saúde/Brasil nas campanhas de controle nacional (GRADONI, 2001; MAUEL, 2002; COSTA *et al.*, 2011), e somente duas vacinas estão licenciadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA- para uso em cães domésticos (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; FERNANDES *et al.*, 2008). Entretanto, tais vacinas não fazem parte do calendário vacinal obrigatório e gratuito e são comercializadas a preços impraticáveis para a maioria da população brasileira.

Embora uma vacina segura e eficaz ainda não tenha sido desenvolvida para atuar em programas de controle oficiais das Leishmanioses, muito esforço tem sido despendido nesta área e vários candidatos vacinais têm sido extensivamente estudados (LEMESRE *et al.*, 2007; ROATT *et al.*, 2012; SINGH e SUNDAR, 2012). Os diferentes imunógenos candidatos para o desenvolvimento de vacinas incluem parasitos mortos, frações purificadas, antígenos recombinantes de *Leishmania*, além de DNA codificante de antígeno (MELBY, 2002). No modelo canino, diferentes estratégias de vacina contra LV têm sido utilizadas. A vacinação com promastigotas mortas ou misturas indefinidas de antígenos induzem resposta imune celular e proteção parcial contra a infecção (GRADONI, 2001). O ligante de fucose manose (FML) purificado de *L. donovani* (BORJA-CABRERA *et al.* 2002) e vários diferentes antígenos recombinantes, obtidos de proteínas purificadas, também conferem pelo menos proteção parcial contra infecção por *L. infantum* em cães (SALDARRIAGA *et al.*, 2006).

### 3.2. VACINAS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Vacinas de proteínas recombinantes são confeccionadas com proteínas imunogênicas do agente patogênico produzidas em sistemas heterólogos. Geralmente são utilizadas proteínas que induzem resposta imunológica capaz de proteger o indivíduo frente à exposição subsequente ao agente. Os sistemas heterólogos mais utilizados para a produção das proteínas recombinantes são *Escherichia coli*, levedura, células eucariotas e baculovírus (CUNHA-NETO, 1999).

A primeira etapa na confecção da vacina consiste na identificação da(s) proteína(s) imunodominante(s) do agente e o gene que a codifica. Esse gene é então clonado em uma molécula circular de DNA (plasmídeo), sob controle de um promotor de procaríotas ou eucariotas. O plasmídeo contendo o gene de interesse é introduzido nas células hospedeiras e, no seu interior o DNA do gene vai ser transcrito e o RNA mensageiro traduzido, resultando na produção da proteína de interesse. Essa proteína será então purificada por métodos bioquímicos e utilizada como vacina. Esse método é muito útil para a produção de grandes quantidades de antígeno (GURUNATHAN *et al.*, 1997; SETH *et al.*, 2006).

A existência de espécies de parasitos resistentes às drogas e o alto custo dos medicamentos disponíveis, uma vez que o controle da doença geralmente inclui extensas áreas populacionais e requer a necessidade de repetição do tratamento para que este seja efetivo, reforça a necessidade de se desenvolverem novos medicamentos, assim como a necessidade de métodos de controle alternativos, em particular a produção de vacinas (PENIDO *et al.*, 1999; BERGQUIST, 1998; VERCRUYSSSE *et al.*, 2004; REED e CAMPOS-NETO, 2003). Vários candidatos a vacinas (proteínas recombinantes) contra malária, leishmaniose, doença de Chagas e esquistossomose humanas têm sido também testados, criando-se perspectivas a curto/médio prazo de elaboração de vacinas efetivas para a prevenção destas parasitoses humanas (KNOX *et al.*, 2001; VERCRUYSSSE *et al.*, 2004; SCHETTERS, 2005; GOOD, 2005; COLER e REED, 2005).

Nosso grupo de pesquisa vem se empenhando no estudo de proteínas de parasitos órtologas a proteínas do hospedeiro, com o intuito de contribuir para o uso no diagnóstico sorológico e desenvolvimento de novas vacinas (CARDOSO *et al.*, 2003; FUJIWARA *et al.*, 2005; MIRET *et al.*, 2008; GIUNCHETTI *et al.*, 2008, MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014a,b, 2015a,b; FIUZA *et al.*, 2015). Dentre elas, destaca-se a proteína peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis*, utilizada no presente trabalho, e que, conjugada

ao adjuvante MPL (Monophosphoryl Lipid A) tem se mostrado um promissor candidato a vacina anti-leishmaniose.

### **3.2.1. Importância dos adjuvantes no desenvolvimento de vacinas**

O termo adjuvante deriva do latim *adjuvare*, que significa ajudar ou adicionar (COUTER & COX, 1997). Os adjuvantes podem ser definidos como substâncias que induzem uma resposta imune mais potente. Em 1920, Ramon descreveu o termo adjuvante ao observar que cavalos que desenvolveram abscessos no sítio da injeção da difteria toxóide produziram títulos mais altos de antitoxinas do que os animais que não desenvolveram os abscessos (RAMON, 1924). GLENNY *et al.* (1926) demonstraram a atividade adjuvante de compostos de alumínio utilizando uma vacina da difteria toxóide precipitada em *alum*. Na década de 1930, um potente adjuvante imunológico composto de uma emulsão água-óleo mineral contendo micobactérias mortas pelo calor foi desenvolvido (FREUND *et al.*, 1937). Este adjuvante foi denominado adjuvante completo de Freund. Apesar de altamente eficaz, o adjuvante Completo de Freund é altamente reatogênico, não podendo ser utilizado em seres humanos e sendo desaconselhado para uso mesmo em animais de laboratório.

Os adjuvantes podem ser divididos em duas classes de acordo com sua origem. A primeira classe abrange os adjuvantes exógenos e a segunda os adjuvantes imunoestimulatórios, podendo ser compostos por substâncias químicas, algumas delas extraídas de plantas, como a saponina, ou serem derivados de patógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) e CpG ODN. O uso destes adjuvantes permite o direcionamento da resposta imunológica, com o favorecimento de determinada função imune (SINGH e SRIVASTAVA, 2003).

Adjuvantes imunoestimulatórios podem desempenhar seu papel atuando em nível de citocinas, pela ativação de moléculas MHC, de sinais co-estimulatórios ou por sinalizações intracelulares. Um representante dessa classe de adjuvantes, o MPL (Monophosphoryl Lipid A), é derivado do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (*Salmonella minnesota* R595). A remoção de um resíduo de fosfato do LPS resulta no MPL, diminuindo assim a toxicidade. Estudos recentes demonstraram que o MPL, assim como o LPS, medeia a ativação imune pela interação com TLR-4. Em vários estudos pré-clínicos, o MPL mostrou ser capaz de induzir a síntese de citocinas do tipo 1 (IL-12, IFN- $\gamma$ , etc.) que promovem a geração de respostas do tipo Th1. Este adjuvante já foi testado em mais de 10.000 indivíduos em combinação com vacinas para câncer (por exemplo, melanoma) e

doenças infecciosas (herpes, hepatite B, malária) com poucos efeitos adversos (SINGH e O'HAGAN, 2002). O MPL já está licenciado para uso em seres humanos em alguns países, compondo a vacina contra a alergia Pollinex Quattro (HOPKINS *et al.*, 2001) e fazendo parte de uma vacina contra melanoma no Canadá (Melacine).

### 3.2.2. Peroxidoxina

Peroxidoxinas, também conhecidas como peroxirredoxinas ou antioxidantes tiol-específicos, compreendem uma família de antioxidantes que tem sido recentemente descobertas em inúmeros procariotos e eucariotos. A sequência gênica e a função protéica das peroxidoxinas são altamente conservadas entre os organismos e podem ser classificadas em dois grupos: 1-Cys e 2-Cys. As peroxidoxinas 1-Cys contêm um resíduo de cisteína conservado na região amino-terminal da proteína, no aminoácido de número 47, ao passo que a peroxidoxina 2-Cys apresenta um segundo resíduo de cisteína conservado na região carboxila-terminal da proteína, no aminoácido da posição 170 (BARR e GEDAMU, 2001).

Até agora foram descritos como substratos de peroxidoxina o peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de alquilo (por exemplo, cumeno e hidroperóxidos de t-butilo), e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). O mecanismo de ação para a destoxificação destes substratos envolve a oxidação do resíduo Cys-47 formando um intermediário de sulfenilo, que reage com o grupo tiol da subunidade adjacente oposta (Cys47 para peroxidoxinas 1-Cys e Cys170 para peroxidoxinas 2-Cys) formando uma ligação intermolecular de dissulfureto (BARR e GEDAMU, 2001; McGONIGLE *et al.*, 1998).

Os substratos das peroxidoxinas sugerem que elas podem desempenhar papéis-chave na defesa contra o estresse oxidativo. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroperóxidos, e ONOO<sup>-</sup> são subprodutos extremamente reativos da redução molecular de O<sub>2</sub> durante o metabolismo celular normal e dentro de fagolisossomas durante a explosão respiratória (Figura 03).

Peroxidoxinas foram identificados em várias espécies de *Leishmania*, incluindo *L. major*, *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum* (BARR E GEDAMU, 2001; CASTRO *et al.*, 2002; FLOHE *et al.*, 2002; LEVICK *et al.*, 1998; WEBB *et al.*, 1998), e vários estudos demonstraram que as peroxidoxinas possuem propriedades imunogênicas (CAMPOS-NETO *et al.*, 2002; COLER *et al.*, 2002; WEBB *et al.*, 1998).

Atualmente tem-se maximizado esforços para aperfeiçoar uma formulação ideal de vacina anti-leishmaniose utilizando a proteína peroxidoxina de *Leishmania braziliensis*,

empregada nesse trabalho. Fundamentados nos riscos teóricos e práticos que uma vacina aplicada durante a gestação pode causar no metabolismo materno ou no desenvolvimento embrionário, é imprescindível a realização de testes que excluam a capacidade teratogênica dessa nova formulação.

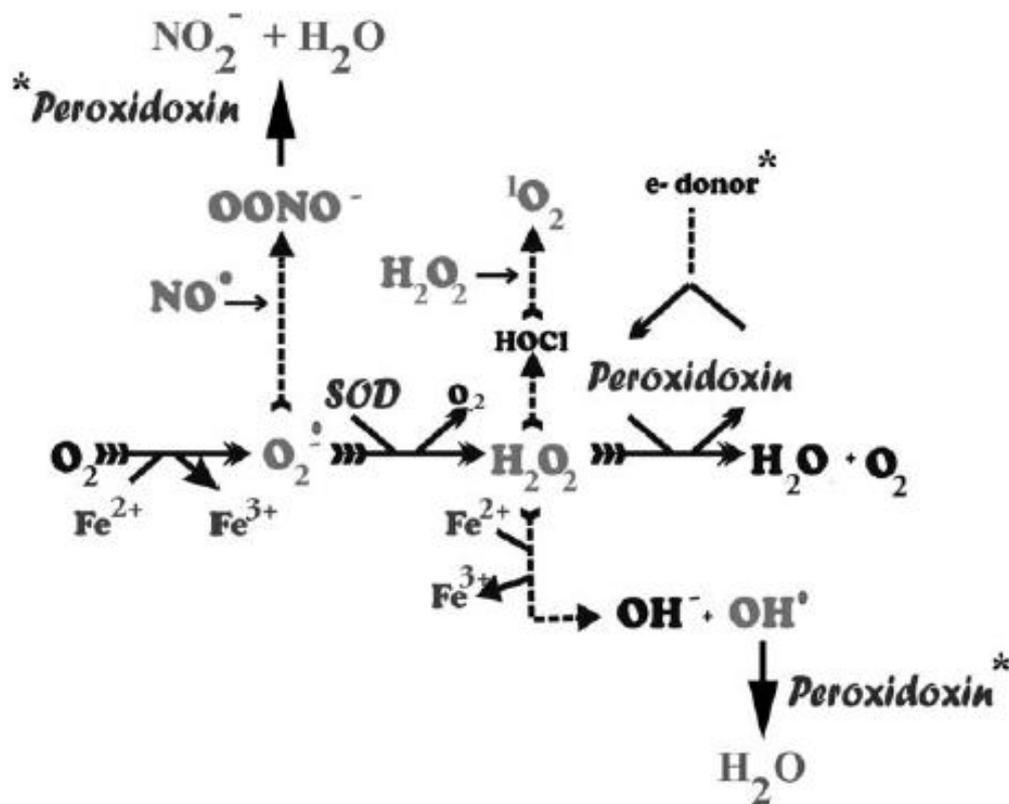


Figura 03 – Reações Celulares que culminam na produção de intermediários de  $O_2$  altamente reativos. O  $O_2$  sofre a redução de um elétron, produzindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que pode interagir com o monóxido de nitrogênio ( $NO^\bullet$ ), originando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).  $O_2^-$  pode dismutar-se espontaneamente ou via superóxido desmutase em  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  pode reagir com  $O_2^-$ ,  $Fe^{2+}$  ou luz ultravioleta originando  $^\bullet OH$ , que reage com reagir com lipídios celulares, proteínas, e DNA provocando danos. Estudos recentes demonstram que a peroxidoxina neutraliza  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$  e  $^\bullet OH$  (BARR e GEDAMU, 2001; SZABÓ *et al.*, 2007).

### 3.3. TERATOGENESE

Durante muitas décadas a placenta foi considerada como uma barreira protetora e intransponível que impedia a atuação de substâncias nocivas ao feto (DALLY, 1998; KOREN *et al.*, 1998) e esta idéia só foi derrubada a partir da identificação da síndrome da

rubéola congênita em 1941 (WEBSTER, 1998). Outro fato marcante foi o da tragédia da talidomida, ocorrida na década de 1960, cujas descobertas científicas representaram um marco para o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa na ciência da teratologia (DAMASCENO *et al.*, 2008). A partir de então o interesse pelo conhecimento, investigação e detecção de agentes teratogênicos aos quais mulheres grávidas possam estar expostas, tem aumentado progressivamente.

Agente teratogênico é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de deficiência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz alteração na estrutura ou função da descendência (SHEPARD, 1995; HANSEN *et al.*, 2002; WANNMACHER, 2004). Para HANSEN *et al.* (2002), são considerados teratogênicos: (1) agentes que tenham exposição danosa documentada em um determinado período do desenvolvimento pré-natal; (2) substâncias cujos efeitos teratogênicos tenham sido claramente demonstrados através de dados estatisticamente significantes em dois ou mais estudos epidemiológicos; e (3) drogas que, mesmo em rara exposição ambiental, estejam associadas com ocorrência de defeitos congênitos, contanto que exista uma cuidadosa descrição de casos clínicos.

A ação de um agente teratogênico na reprodução é variada. Eles podem provocar aborto, malformações, retardo do crescimento intra-uterino ou deficiência mental. Sua ação depende de fatores como o estágio do desenvolvimento do conceito, a relação dose-efeito, o genótipo materno-fetal e o mecanismo patogênico específico de cada agente (SCHÜLLER-FACCINI e SCHVARTZMAN, 2001; SCHÜLLER-FACCINI, 2002).

Assim, a avaliação do risco de novas moléculas ou de moléculas suspeitas de causar danos reprodutivos à população, baseia-se na importância de estabelecer, com segurança, os níveis de exposição permitidos para a espécie humana e/ou para outras espécies animais (DAMASCENO *et al.*, 2008).

### **3.4. IMUNIZAÇÃO E GESTAÇÃO**

A proteção da mulher grávida, prevenindo-a de doenças e complicações da gravidez, e a proteção do feto, recém-nascido e/ou lactente, dotando-o de anticorpos para que possa resistir a infecções durante o período de maior vulnerabilidade são os principais objetivos da imunização na gravidez (SUCCI e FARHAT, 2008; TAVARES *et al.*, 2011). Porém, poucos são os estudos randomizados e controlados que visam aferir a segurança de vacinas para uso em animais prenhes ou mulheres gestantes. No caso de humanos, são grandes as dificuldades éticas na realização desses estudos, dificultando uma adequada compreensão

dos mecanismos imunológicos de resposta às vacinas em grávidas. Muito da experiência da utilização de vacinas em gestantes advém do uso inadvertido desses imunobiológicos nessas mulheres. Sendo assim, a utilização de modelos animais é importante para o entendimento da segurança dessas vacinas (PIMENTEL, 2010).

ELAHI *et al.* (2006) demonstraram que a imunização realizada durante a gestação em porcas aumentou significativamente os níveis de anticorpos IgG e IgA específicos para *Bordetella pertussis* em soro e colostro materno. Estes anticorpos foram transmitidos eficientemente aos seus filhotes, através da análise no fluido do lavado bronco alveolar. Também foi observada, após amamentação, uma maior proteção conferida aos seus filhotes após desafio intrapulmonar com *B. pertussis*, demonstrando a importância dos anticorpos IgG e IgA passivamente adquiridos pelo colostro contra a bactéria.

FURUTA *et al.* (1982) estudaram o comportamento da cinética de anticorpopogênese em cobaias inoculadas com toxóide diftérico e a dinâmica da imunidade passiva naturalmente transmitida aos filhotes. Os autores verificaram que a síntese de antitoxina diftérica persiste, em títulos detectáveis, até 36 meses após a vacinação e que os anticorpos são transferidos passivamente da mãe vacinada para os filhotes via placenta, perdurando em títulos detectáveis até cerca de três meses de idade dos mesmos.

Foi avaliada a cinética de anticorpos colostrais antitoxina épsilon de *Clostridium perfringens* em cordeiros nascidos de ovelhas vacinadas (30 dias antes do parto) com uma dose única da vacina comercial polivalente contra clostridioses, contendo toxóide épsilon. Os autores constataram que foi induzida a imunidade passiva em níveis considerados protetores ( $>0,5$  UI/mL) aos cordeiros por, no mínimo, 60 dias de idade (COSTA *et al.*, 2012).

É importante salientar que durante o período gestacional, o corpo materno sofre diversas alterações endócrinas, físicas, psicológicas e também em seu perfil imunológico para se adaptar à presença do feto. O sistema imune materno está em íntimo contato com células e tecidos do feto semi-alogênico, que possui 50% de material genético paterno, o que o caracteriza como estranho ao organismo materno. Desta forma, mecanismos específicos devem agir para modular e moderar o sistema imune materno, impedindo que gestantes rejeitem seus fetos (MICHELON *et al.*, 2006). Dentre os fatores envolvidos nessa complexa rede imunomodulatória para a tolerância e regulação do desenvolvimento fetal e formação da placenta, destacam-se: a influência hormonal sobre o sistema imune materno, o reconhecimento das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade paterno (expressas pelo embrião), as citocinas liberadas no meio, o controle da citotoxicidade

direta das células Natural Killer uterinas e atividade das células T regulatórias. Sendo assim, alterações nestes mecanismos podem levar a complicações durante a gravidez (HVIID, 2006).

Uma importante alteração imunológica em gestantes foi apresentada por Wegmann *et al.* (1993). De acordo com esta proposição, citocinas de perfil Th1 exercem efeito deletério, induzindo a reação inflamatória e a necrose placentária, podendo assim comprometer o desenvolvimento do feto e/ou placenta. Por outro lado, as citocinas Th2 são benéficas para a gestação, promovendo a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação, além disso, desempenham um papel protetor sobre a unidade feto-placentária inibindo a produção de citocinas do tipo Th1, por um mecanismo de *feedback*. Vários autores associam parcialmente o sucesso gestacional ao desvio do perfil de resposta Th1- Th2 (PICCINI *et al.*, 1998; SAITO *et al.*, 1999; MICHIMATA *et al.*, 2002, SARAFANA *et al.*, 2007; DAHER e MATTAR, 2009).

Esta intrincada rede de sinalização via citocinas ganha novas dimensões quando, associada à gestação ocorre infecções patogênicas ou imunizações que desencadeiam a produção predominante de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ), que pode comprometer o sucesso da gestação (KRISHNAN *et al.*, 1996).

A vacinação na gravidez comporta riscos reais, teóricos e hipotéticos, como a transmissão do vírus vivo-atenuado para a placenta ou feto, o risco de efeitos reprodutivos, reações idiossincrásicas ou imprevisíveis e ineficácia da vacina (TAVARES *et al.*, 2011) No Brasil, Ministério da Saúde preconiza que as vacinas que contém componentes vivos devem ser evitadas durante a gestação, , enquanto vacinas inativas são seguras e podem ser utilizadas (SUCCI e FARHAT, 2006).

Por se tratar de uma tecnologia atual e com poucas substâncias liberadas para utilização em humanos ou animais, a literatura não fornece dados sobre a avaliação da segurança de vacinas produzidas com proteínas recombinantes administradas durante o período gestacional, assim como informações acerca da transferência passiva da imunidade conferida por elas. Considerando as vantagens que o esquema vacinal durante a gestação pode proporcionar, é válida a realização de experimentos que visam avaliar a segurança desse procedimento (PUIG BARBERA, 2004; BADILA *et al.*, 2007; SUCCI e FARHAT, 2006).

### **3.4.1. Transferência passiva de imunidade**

A capacidade dos animais de produzir anticorpos é essencial para a defesa dos mamíferos quando expostos a microrganismos e/ou substâncias antigênicas. A proteção transferida da mãe para o filho via placenta, colostro, ou por ambos, recebe a denominação de imunidade passiva, atribuída em função da não participação do sistema de defesa do neonato (JEFFCOTT, 1972; ARGENZIO, 1984, BAXTER, 2011).

A permeabilidade da placenta é inversamente proporcional ao número de camadas de tecidos interpostas entre a circulação materna e a fetal. Placentas do tipo endotélio-corial (humanos, primatas e carnívoros) e hemocorial (roedores) são altamente permeáveis a imunoglobulinas e permitem a passagem de anticorpos da mãe para os fetos. Por outro lado, placentas do tipo epitélio-corial (eqüídeos) e sindesmo-corial (ruminantes, suídeos) são virtualmente impermeáveis à passagem de imunoglobulinas (McCOY *et al.*, 1970; SIMPSON, 1972; SMEATON, 1985; PORTER, 1976, HASSELQUIST E NILSSON, 2012). Sendo assim, humanos, primatas, roedores e carnívoros transferem imunoglobulinas através da placenta para o feto. Em espécies como eqüídeos, suídeos e ruminantes, não ocorre passagem significativa de anticorpos pela placenta. Em consequência, os recém-nascidos dessas espécies são desprovidos de imunidade ao nascer e são muito dependentes da imunidade conferida pelo colostro para sobreviverem (MARÓDI, 2006).

Em todas as espécies de mamíferos, no final da gestação ocorre uma passagem significativa de imunoglobulinas do soro para a glândula mamária. Com isso, ocorre uma concentração muito grande de anticorpos no colostro. O colostro é definido como a primeira secreção láctea produzida, coletada nos primeiros 2 a 3 dias de lactação ou até uma semana após o parto (ISLAM *et al.*, 2006). Tanto o colostro, como o leite materno, apresentam em sua composição quantidades adequadas de lipídios, carboidratos e proteínas, além de substâncias imunoativas que conferem proteção ao recém-nascido para uma ampla gama de doenças infecciosas e não infecciosas (MORCELI *et al.*, 2011).

Ao ingerirem o colostro, os recém-nascidos recebem imunoglobulinas específicas para vários agentes infecciosos para os quais a mãe possui anticorpos. Grande parte das imunoglobulinas (IgG, principalmente) são absorvidas no trato gastrointestinal do recém-nascido (primeiras 24-36 horas) indo para o sangue. Uma parte (IgA e IgM) pode permanecer no lúmen intestinal onde confere proteção contra agentes infecciosos nesse local (ISLAM *et al.*, 2006)

Tanto a imunidade adquirida pela placenta como a colostrada são passageiras, duram de semanas a alguns meses, que é o tempo de duração dos anticorpos recebidos (ISLAM *et al.*, 2006).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar se o processo de imunização com a proteína recombinante peroxidoxina de *Leishmania braziliensis*, administrada no período gestacional de ratas, pode causar prejuízos maternos e fetais e avaliar a transferência passiva para o recém-nascido de anticorpos reativos específicos através da passagem transplacentária e do aleitamento materno.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar se a vacina administrada durante a prenhez induz alterações na performance reprodutiva maternal;
- Avaliar o desenvolvimento fetal da prole de ratas vacinadas;
- Determinar possíveis efeitos teratogênicos da vacina através de análises das frequências de anomalias fetais;
- Determinar se a vacina induz a produção de anticorpos IgG específicos nas ratas vacinadas;
- Avaliar se anticorpos específicos são transferidos passivamente para o recém-nascido através da passagem transplacentária e do aleitamento materno, respectivamente.
- Avaliar a persistência da produção de anticorpos induzidos pelo processo de imunização nos filhotes até a 3ª semana de idade.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. ÉTICA**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT (Processo N°. 23108.007931/14-0).

### **5.2. PRODUÇÃO DA PEROXIDOXINA RECOMBINANTE**

Para a realização desse trabalho, a proteína peroxidoxina recombinante foi produzida no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) /Depto. de Parasitologia/ICB/UFMG/Belo Horizonte-MG, pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e gentilmente cedidas para o Laboratório de Fisiologia Reprodutiva (FisioTox)/UFMT/Barra do Garças, onde foram feitas as imunizações.

#### ***5.2.1. Expressão das proteínas recombinantes***

Para indução da expressão das proteínas recombinante, colônias isoladas no sistema de clonagem criopreservadas no LIGP/UFMG-BH foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura 2xYT (Kanamicina 50 µg/mL e Gentamicina 20 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram inoculadas em Erlemeyer contendo 500 mL de meio 2xYT e cultivadas até densidade óptica (DO<sub>600</sub>) de 0,6-0,8 a 30°C sob agitação a 200 rpm. Após atingir a DO desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,1mM de IPTG (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 24 horas a 12°C sob agitação a 200 rpm (COITINHO *et al.*, 2012). Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 6000 x g, 30 minutos a 4 °C e em seguida armazenada a -80°C. Alíquotas da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução a expressão, foram também congeladas para serem utilizadas como controle de expressão.

#### ***5.2.2. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade e gel filtração***

O pellet contendo a cultura após a etapa de expressão foi ressuspenso em 100 mL de PBS contendo 30 mM de Imizadol e lisozima 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o extrato foi lisado no homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin, Mannheim, Alemanha) após 5 ciclos de homogeneização conforme recomendado pelo fabricante do equipamento. Em seguida a amostra foi centrifugada por 8000 x g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante (fração

solúvel) foi coletado e a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade no sistema “*ÄKTAprime plus*” (GE Healthcare, Piscataway, EUA). Nesta etapa a fração sobrenadante foi aplicada em uma coluna “*HisTrap HP*” de 5 mL (GE Healthcare, Piscataway, EUA). A coluna foi previamente lavada utilizando 5 vezes o seu volume com o tampão A (PBS contendo imidazol 30 mM). A eluição foi realizada através da adição do tampão B (PBS contendo imidazol 500 mM). Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína recombinante foi concentrada na coluna Amicon<sup>®</sup> ultra 15 Centrifugal Filters 10,000 NMWL (Millipore, Darmstadt, Alemanha) e melhor purificada na coluna de gel filtração Superdex<sup>™</sup> 200 (GE Healthcare, Piscataway, EUA). Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%.

### ***5.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE***

As amostras obtidas nas expressões e purificações foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8. As amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas tampão de amostra (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), pré-aquecidas durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e posteriormente aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob à voltagem constante de 120 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 12-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) e em seguida descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

### ***5.2.4. Ensaio de dosagem das proteínas***

As amostras de proteína recombinante purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA) utilizando o kit “*BCA Protein Assay Reagent*” (Thermo Scientific, Waltham, EUA) de acordo com recomendações do fabricante.

### 5.3 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (Figura 04A), em idade reprodutiva (em torno de 90 dias de vida). Os animais foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Campus Universitário do Araguaia (CUA) – UFMT e adaptados no biotério do Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FisioTox) (Figura 04B) durante sete dias. Neste período, eles permaneceram em gaiolas coletivas com capacidade máxima de quatro animais (Figura 04C), sob temperatura controlada ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.



**Figura 04.** **A:** *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. **B:** Bioério do Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FisioTox). **C:** Gaiolas coletivas com capacidade máxima de quatro animais.

### 5.4 - ACASALAMENTO

Após o período de adaptação, iniciou-se a fase de acasalamento. Para o acasalamento, as ratas foram distribuídas quatro a quatro em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha, na presença de um rato macho durante o período noturno (das 18 horas às 7 horas). Na manhã subsequente, foi realizado esfregaço vaginal para análise do material citológico em microscopia de luz. A presença de espermatozoides e as

características da fase estro do ciclo estral (Figura 05) confirmaram o diagnóstico de prenhez e este é considerado o dia zero de prenhez (VOLPATO *et al*, 2008). O procedimento para acasalamento teve duração máxima de 15 dias para cada animal e foi realizado até a obtenção de número amostral.

As fêmeas prenhes foram mantidas em gaiolas individuais de polipropileno até o 21º dia de prenhez.



**Figura 05.** Lamina de esfregaço vaginal com células queratinizadas (fase estro do ciclo estral) e espermatozoides.

### 5.5 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais

- **Controle** (n=12 animais): Ratas que receberam injeção subcutânea com 200µL de solução salina
- **Adjuvante** (n=11 animais): Ratas que receberam injeção contendo adjuvante MPL (10µg de MPL e 200 µL solução salina);
- **Vacina** (n=11 animais): Ratas que receberam injeção com adjuvante mais a proteína peroxidoxina recombinante MPL (10µg de MPL, 10 µg de proteína e 200 µL solução salina).

## 5.6 –IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

O tratamento foi administrado a ratas prenhes por via subcutânea, na região dorsal (Figura 06). Os animais receberam 3 doses da vacina, sendo a primeira dose administrada no dia 0 de gestação e as demais em um intervalo de 7 dias entre cada dose (dias 0, 7 e 14 de gestação).



**Figura 06.** Imunização por via subcutânea, na região dorsal.

## 5.7. - DADOS DA PREENHEZ

### 5.7.1. *Toxicidade aguda das progenitoras*

Durante o tratamento, as ratas foram avaliadas quanto à presença de manifestações de sinais de toxicidade aguda, tal como: diarreia, piloereção, estresse, tremores, salivação e hemorragia.

### 5.7.2. *Avaliação da performance reprodutiva*

Na manhã do 21º dia de prenhez (das 8 às 10 horas), as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (Hypnol<sup>®</sup>) a 3% e, posteriormente, submetidas a dessangramento. Em seguida, foi realizada laparotomia com exposição dos cornos uterinos e o número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e fetos vivos e mortos foram contados. Na ausência de pontos de implantações visíveis, os cornos uterinos foram submetidos à solução de Salewski (1964). A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela seguinte fórmula:  $\text{número de corpos lúteos} - \text{número de implantações} \times 100 / \text{número de corpos lúteos}$ . A taxa de perda pós-implantação:  $\text{número de implantações} - \text{número de fetos vivos} \times 100 / \text{número de implantações}$  (DAMASCENO *et al.*, 2008).

### **5.7.3 - Resultados placentários e fetais**

As placentas, livres de membrana e cordão umbilical, foram pesadas em balança analítica. A eficiência placentária foi determinada pela relação entre o peso fetal e o peso placentário (VOLPATO *et al.*, 2015). Cada feto foi pesado. A classificação dos pesos fetais foi realizada de acordo com a média + desvio padrão (DP) dos pesos corporais fetais obtidos no grupo controle que definiu três classes diferentes de pesos de recém-nascidos (VOLPATO *et al.*, 2011) em: AIP - recém-nascidos de peso adequado para idade gestacional: peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos 1,0 x desvio-padrão; PIP - recém-nascidos pequenos para idade gestacional: peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos 1,0 x desvio-padrão; GIP - recém-nascidos grandes para idade gestacional: peso corpóreo superior à média do peso de grupo controle mais 1,0 x desvio-padrão.

### **5.7.4 - Teratogenicidade**

#### **5.7.4.1. Análise das anomalias externas**

Depois de pesados, os fetos foram analisados macroscopicamente quanto à conformação da caixa craniana, implantação dos olhos, orelhas, fenda labial, membros anteriores e posteriores, cauda e presença da perfuração anal com o objetivo de detectar anormalidades externas (Figura 07) (DAMASCENO *et al.*, 2008).

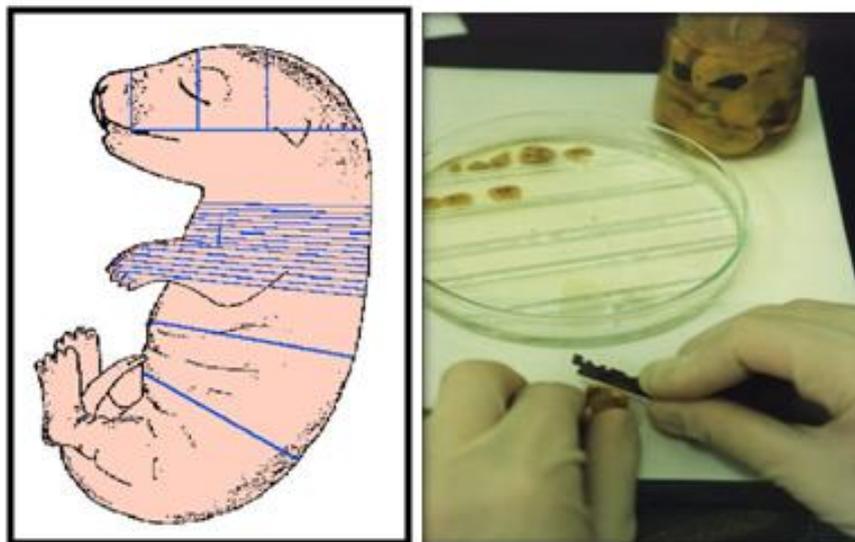


**Figura 07.** Análise de anomalias fetais externas

#### **5.7.4.2. Análise das anomalias viscerais**

Imediatamente após o exame externo, metade dos recém-nascidos de cada ninhada foi colocada em solução de Bodian para fixação das estruturas viscerais e descalcificação

dos ossos. Completada a fixação, foi utilizado o método de secção seriada proposto por Wilson (1965), para observação de anomalias viscerais (Figura 08).



**Figura 08.** Processamento fetal para análise de anomalias viscerais. Cortes seriados de Wilson.

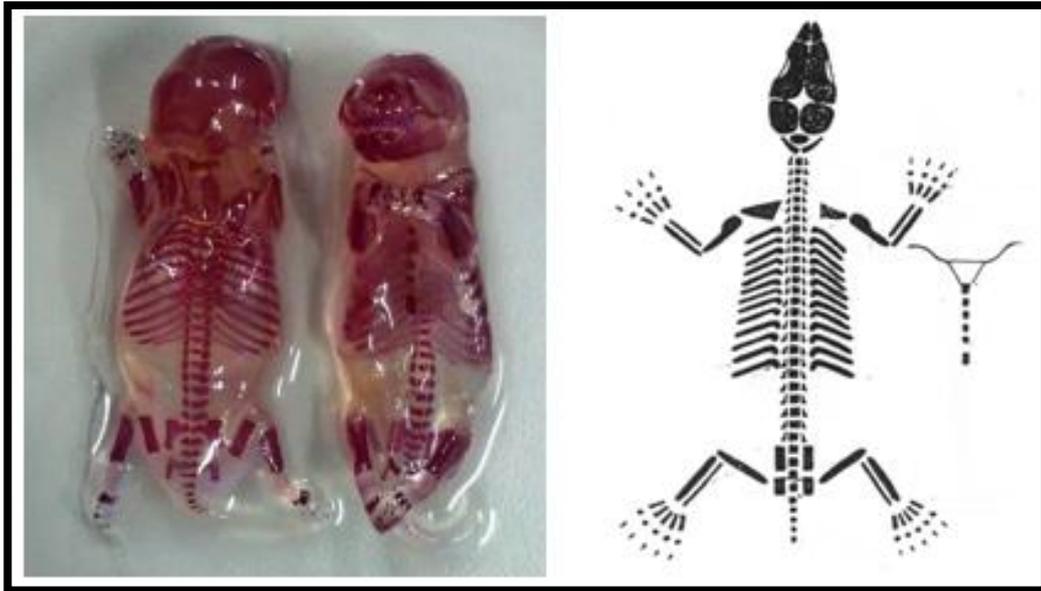
#### **5.7.4.3. Análise das anomalias esqueléticas**

A metade restante dos recém-nascidos de cada ninhada foi colocada em álcool (70%) e, após 24 horas, foram eviscerados, diafanizados e corados com alizarina (Figura 09). Para análise das anomalias esqueléticas foi utilizado o método de STAPLES & SCHNELL (1964). Os centros de ossificação foram contados e analisados usando parâmetros propostos por ALIVERTI *et al.* (1979).

### **5.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

#### **5.8.1. Ensaio Imunoenzimático para detecção de IgG anti-peroxidoxina**

O protocolo para detecção de IgG anti-peroxidoxina foi adaptado de MINOZZO *et al.* (2004). O antígeno (proteína peroxidoxina recombinante) foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, até as concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foram testadas na padronização. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução antigênica por poço de placas de microtitulação (NUNC<sup>®</sup> Maxisorp-Demarck) e a placa foi incubada *overnight* a 4-8 °C. O excesso de antígeno foi removido por duas lavagens com tampão fosfato salino (0,01 M) acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20<sup>®</sup>, pH 7,4 (PBST). O bloqueio dos poços foi realizado com 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2% de albumina de soro bovino, por uma hora, a 37 °C.



**Figura 09.** Processamento fetal para análise de anomalias esqueléticas.

Para determinar uma diluição ideal de soro, após a aspiração da solução de bloqueio, volume de 100  $\mu\text{L}$  de várias diluições (de 1:50 a 1: 3.276.800) de soro em PBST foi analisado em duplicata. Os soros foram incubados a 37°C por uma hora, e posteriormente foi adicionado o anticorpo secundário. O conjugado utilizado consistia em anticorpos contra IgG de rato marcados com a enzima peroxidase (SIGMA) . Optou-se por testar as diluições de 1:1000, 1:2000 e 1:500, em um volume total de 100  $\mu\text{L}$  por poço. A placa foi incubada a 37 °C por uma hora e procedidas mais três lavagens com PBST.

O OPD (orto-fenileno-diamina, SIGMA P6787) foi utilizado como substrato e o peróxido de hidrogênio, como catalizador, tendo o tampão citrato, pH 5,0 como veículo. Após adição de 100 $\mu\text{L}$  desta mistura por poço, a placa foi incubada em temperatura ambiente, por 20 minutos, ao abrigo de luz. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  por poço de uma solução de ácido sulfúrico a 5%. Os valores de absorbância foram obtidos em leitora (BioRad-Model 550) com filtro de 450 nm.

Após as análises dos resultados, optou-se como diluições de trabalho de soro 1:100, de antígeno 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e do anticorpo secundário de 0,025  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O ponto de corte da reação entre soros reagentes e não reagentes, foi determinado pela média aritmética dos valores de absorbância das amostras de soros controle negativo acrescido de três desvios padrão da média. A titulação de IgG anti-peroxidoxina foi realizada a fim de se obter a quantidade relativa de anticorpos presentes no soro dos animais imunizados.

### **5.8.2. Avaliação da Imunização transplacentária**

Para a avaliação da concentração de anticorpos IgG específicos, amostras de sangue foram coletadas ao nascimento. Após a coagulação do sangue, alíquotas de soro foram obtidas por centrifugação e armazenadas em freezer a -80 °C até o momento do uso.

O perfil da resposta humoral nos animais vacinados foi avaliado através da produção de anticorpos IgG específicos às proteínas recombinantes. O material foi submetido ao teste de ELISA conforme padronizado e descrito no item 5.8.1, para determinação dos níveis de anticorpos nos diferentes grupos.

### **5.8.3. Avaliação da Imunização pelo leite materno**

Para avaliação da imunização adquirida pelo leite materno, algumas ratas tiveram seus filhotes (geração F<sub>1</sub>) por parto vaginal. De acordo com a origem materna, a geração F<sub>1</sub> foi classificada em:

- *Grupo F<sub>1</sub> controle - Mãe controle* (n=10) – constituído de recém-nascidos provenientes de ratas controle (injeção com salina).
- *Grupo F<sub>1</sub> vacina - Mãe vacina* (n=10) - constituído de recém-nascidos provenientes de ratas vacinadas (injeção com adjuvante mais proteína recombinante).
- *Grupo F<sub>1</sub> vacina - Mãe controle* (n=10) - constituído de recém-nascidos provenientes de ratas vacinadas (injeção com adjuvante mais proteína recombinante), mas amamentadas por ratas controle (injeção com salina).
- *Grupo F<sub>1</sub> controle - Mãe vacina* (n=10) - constituído de recém-nascidos provenientes de ratas controle (injeção com salina), mas amamentadas por ratas vacinadas (injeção com adjuvante mais proteína recombinante).

No 21º dia de lactação, mães e filhotes foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol<sup>®</sup>) a 3% e, posteriormente, submetidos a dessangramento para obtenção de sangue para testes de imunização, como descrito anteriormente. As taxas de transferência passiva de anticorpos IgG anti-peroxidoxina via placenta e aleitamento foram expressas em porcentagem definidas como a razão entre os níveis de IgG no soro fetal e níveis de IgG no soro materno multiplicados por 100 (QUINELLO *et al*, 2010).

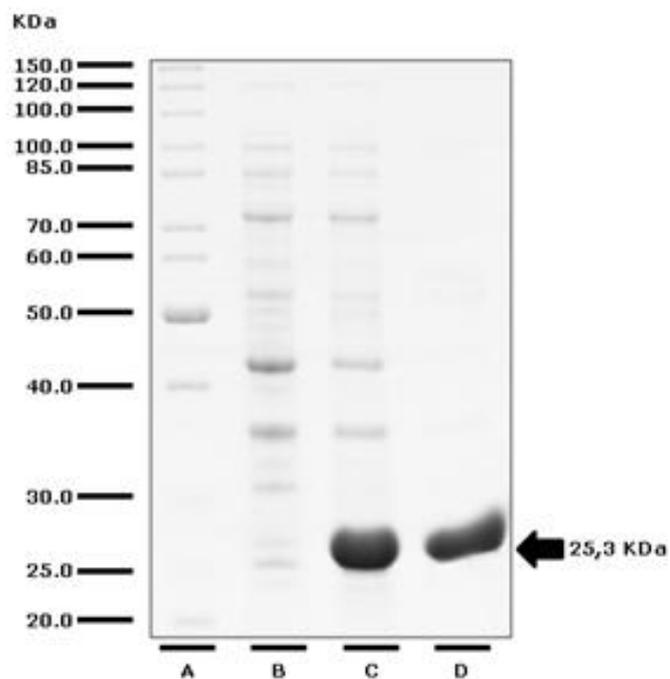
### **5.9. - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi realizada ANOVA seguida pelo Teste de Student-Newman-Keuls para comparação dos valores médios entre os grupos experimentais. Para valores médios entre duas variáveis foi utilizado Teste t de Student. Para análise estatística das proporções, foi utilizado Teste Exato de Fisher. Foi considerado o limite mínimo de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### **6.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PEROXIDOXINA RECOMBINANTE**

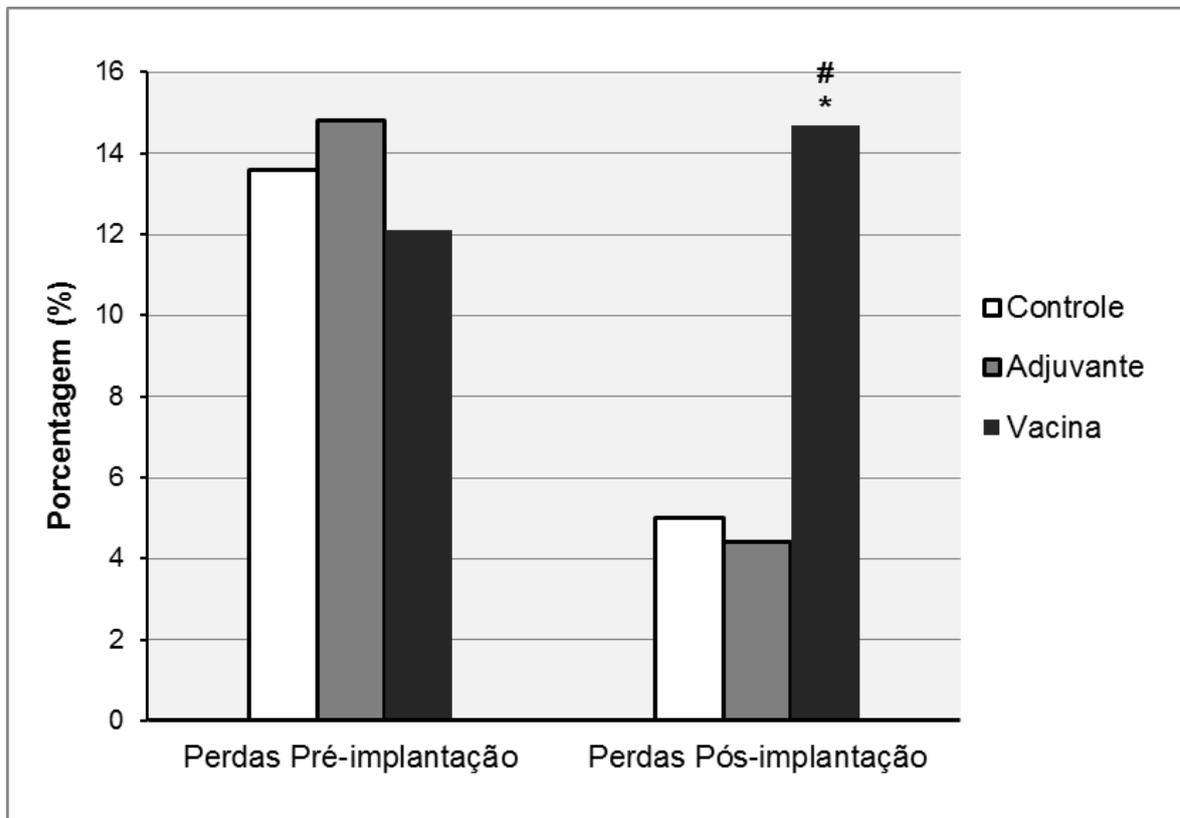
A purificação da proteína recombinante peroxidoxina, de 25,3 kDa, foi feita a partir de bactérias *E. coli* BL-21(DE3) transformadas com o plasmídeo *pET28a-TEV*. A purificação foi realizada no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. Após a purificação, para confirmar o tamanho da proteína e detectar sua presença, a proteína foi separada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12,5% e, posteriormente, corado pela com solução de Coomassie Blue (Figura 10).



**Figura 10.** Expressão e purificação da proteína peroxidoxina recombinante, separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% corado com Coomassie Blue. (A) Padrão de peso molecular (B) lisado de cultura antes e depois (C) da indução com IPTG e purificação da proteína peroxidoxina recombinante (peso: 25,3 kDa) (D) por filtração em gel.

## 6.2. DADOS MATERNOS

A Figura 11 apresenta as taxas de perdas embrionárias antes e após o processo de implantação. Os animais do grupo vacina apresentaram aumento estatisticamente significativo da perda pós-implantação em relação aos grupos controle e adjuvante.



**Figura 11.** Porcentagem de perdas pré- e pós-implantação de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

\* $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste exato de Fisher).

# $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo adjuvante (Teste exato de Fisher).

### 6.3. DADOS FETAIS

#### 6.3.1. Resultados placentários e fetais

O tratamento com o adjuvante ou com a vacina não alterou o peso fetal e sua classificação. O peso e a eficiência placentária também não diferiram estatisticamente em comparação com o grupo controle (Tabela I).

**Tabela I.** Dados dos pesos dos fetos e placentas de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

	Grupos		
	Controle	Adjuvante	Vacina
Peso fetal (g) <sup>a</sup>	5,06 ± 0,50	5,04 ± 0,56	5,18 ± 0,51
Fetos PIP (%) <sup>b</sup>	14,32	13,81	11,53
Fetos AIP (%) <sup>b</sup>	74,30	75,69	70,54
Fetos GIP (%) <sup>b</sup>	11,38	10,30	17,93
Peso placentário (g) <sup>a</sup>	0,50 ± 0,08	0,49 ± 0,07	0,50 ± 0,07
Eficiência placentária <sup>a</sup>	10,47 ± 1,90	10,41 ± 1,65	10,47 ± 1,74

*Dados mostrados como média ± desvio-padrão e proporções (%). AIP - recém-nascidos de peso adequado para idade gestacional; PIP - recém-nascidos pequenos para idade gestacional; GIP - recém-nascidos grandes para idade gestacional.*

*p>0,05 – sem diferença estatisticamente significativa (<sup>a</sup>ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls; <sup>b</sup>Teste Exato de Fisher).*

#### 6.3.2. Centros de ossificação fetais

A Tabela II mostra os centros de ossificação dos fetos. O número de ossos encontrados nos centros de ossificação específicos foi estatisticamente semelhante entre todos os grupos experimentais. O mesmo foi observado na contagem total dos centros de ossificação.

**Tabela II.** Médias e respectivos desvios-padrão dos centros de ossificação de fetos de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

	Grupos		
	Controle	Adjuvante	Vacina
Falanges anteriores	3,46 ± 0,45	3,19 ± 1,01	3,13 ± 0,61
Metacarpos	3,87 ± 0,45	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Falanges posteriores	1,16 ± 1,14	0,63 ± 0,71	0,84 ± 0,95
Metatarsos	4,93 ± 0,09	4,82 ± 0,30	4,91 ± 0,14
Vertebra caudal	3,73 ± 1,30	3,47 ± 0,61	3,87 ± 0,90
Esternébrios	5,99 ± 0,04	5,98 ± 0,05	5,97 ± 0,06
Total	23,14 ± 2,63	22,09 ± 2,11	23,01 ± 2,28

*p*>0,05 – sem diferença estatisticamente significativa (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

### 6.3.3. Incidência de anomalias fetais

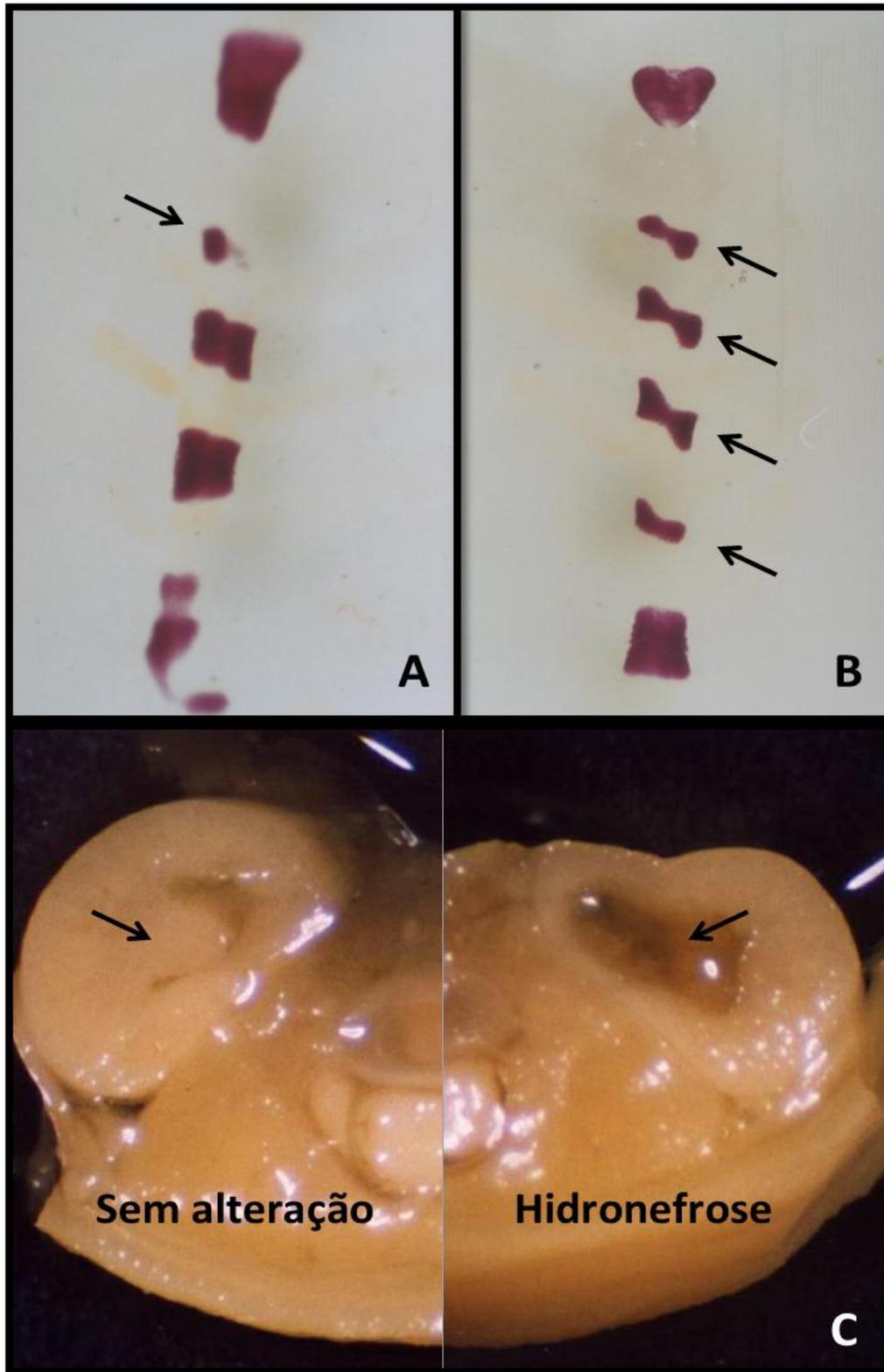
A análise da incidência de anomalias externas, esqueléticas e viscerais foi realizada em 397 fetos. Conforme demonstrado na Tabela III, a frequência de fetos com alterações morfológicas externas não diferiu entre os grupos experimentais (*p*>0,05). Foram observadas alterações em anomalias específicas, no qual houve aumento significativo na ossificação incompleta do esternébrio (Figura 12A) dos fetos do grupo adjuvante e diminuição na frequência de esternébrios assimétricos. No entanto, não foi observado alteração em relação ao número total de anomalias esqueléticas (Figura 12B). A análise das anomalias viscerais evidenciou que ratas vacinadas apresentaram aumento significativo de recém-nascidos afetados. Neste grupo houve aumento do total de anomalias viscerais devido ao aumento significativo de hidronefrose (Figura 12C).

**Tabela III.** Frequência de anomalias em fetos de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

Variáveis	Grupos		
	Controle	Adjuvante	Vacina
<b>Anomalias Externas</b>			
Número de fetos examinados ( ninhada)	140 (13)	136 (11)	121 (11)
Número total de fetos (%) com alteração	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0 (0,0%)
Média % fetos com alteração por ninhada (média ± DP)	0,0 ± 0,0	2,3 ± 5,7	0,0 ± 0,0
<i>Gastrosquise</i>	0 (0,0%)	2 (1,4%)	0 (0,0%)
<i>Hipoplasia caudal</i>	0 (0,0%)	1 (0,7%)	0 (0,0%)
<b>Anomalias Esqueléticas</b>			
Número de fetos examinados ( ninhada)	76 (13)	72 (11)	66 (11)
Número total de fetos (%) com alteração	33 (43,4%)	33 (45,8%)	27 (40,9%)
Média % fetos com alteração por ninhada (média ± DP)	46,4 ± 29,7	46,8 ± 21,1	39,1 ± 29,8
<i>Ossificação incompleta do crânio</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (3,0%)
<i>Ossificação incompleta dos centros vert.</i>	1 (1,3%)	5 (6,9%)	1 (1,5%)
<i>Centros vertebrais assimétricos</i>	1 (1,3%)	2 (2,8%)	4 (6,1%)
<i>Centros vertebrais bipartidos</i>	0 (0,0%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)
<i>Costelas supranumerárias</i>	10 (13,1%)	6 (8,3%)	11 (16,7%)
<i>Costela em onda</i>	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Agenesia de esternébrio</i>	1 (1,3%)	1 (1,4%)	2 (3,0%)
<i>Esternébrio com ossificação incompleta</i>	8 (10,5%)	19 (26,4%)*	8 (12,1%)
<i>Esternébrio bipartido</i>	4 (5,3%)	2 (2,8%)	5 (7,6%)
<i>Esternébrio assimétrico</i>	31 (43,0%)	24 (33,3%)	14 (21,2%)*
<b>Anomalias Viscerais</b>			
Número de fetos examinados ( ninhada)	64 (13)	64 (11)	56 (11)
Número total de fetos (%) com alteração	21 (32,8%)	25 (39,1%)	32 (57,1%)*
Média % fetos com alteração por ninhada (média ± DP)	33,7 ± 24,5	44,7 ± 29,4	55,2 ± 27,6
<i>Traquéia alargada</i>	1 (1,7%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)
<i>Hidroureter</i>	10 (15,6%)	16 (25,0%)	16 (28,6%)
<i>Úreter sinuoso</i>	5 (7,8%)	1 (1,7%)	4 (7,1%)
<i>Cálice alargado</i>	2 (3,1%)	5 (7,8%)	2 (3,6%)
<i>Hidronefrose</i>	4 (6,2%)	3 (4,7%)	11 (19,6%)*#
<i>Ectopia renal</i>	1 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

\* $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste exato de Fisher).

# $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo adjuvante (Teste exato de Fisher).

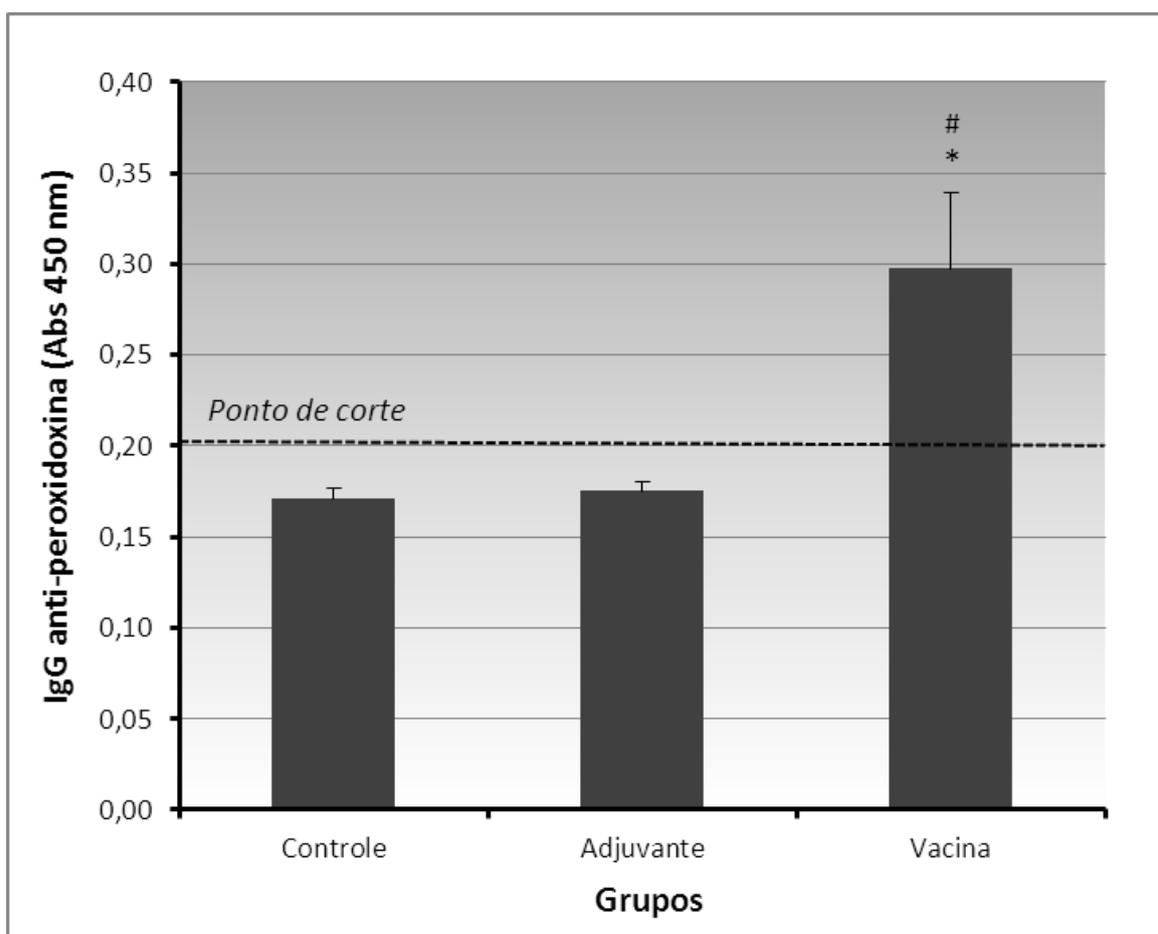


**Figura 12.** **A:** Ossificação incompleta do esternébrio (seta). **B:** Esternébrios assimétricos (setas). **C:** Cálice renal dilatado (seta), uma das alterações necessárias para constatação de hidronefrose.

## 6.4. DADOS IMUNOLÓGICOS

### 6.4.1. Detecção de anticorpos IgG maternos reativos a peroxidoxina

Os valores da absorbância de IgG, obtidos em amostras de soro materno diluídas de 1:100, estão representadas na Figura 13. O ponto de corte (*cut off*) foi determinado e os animais que apresentaram absorbância acima de 0,190 nm foram considerados imunizados. O grupo vacina apresentou aumento significativo nos níveis de IgG em relação aos demais grupos.



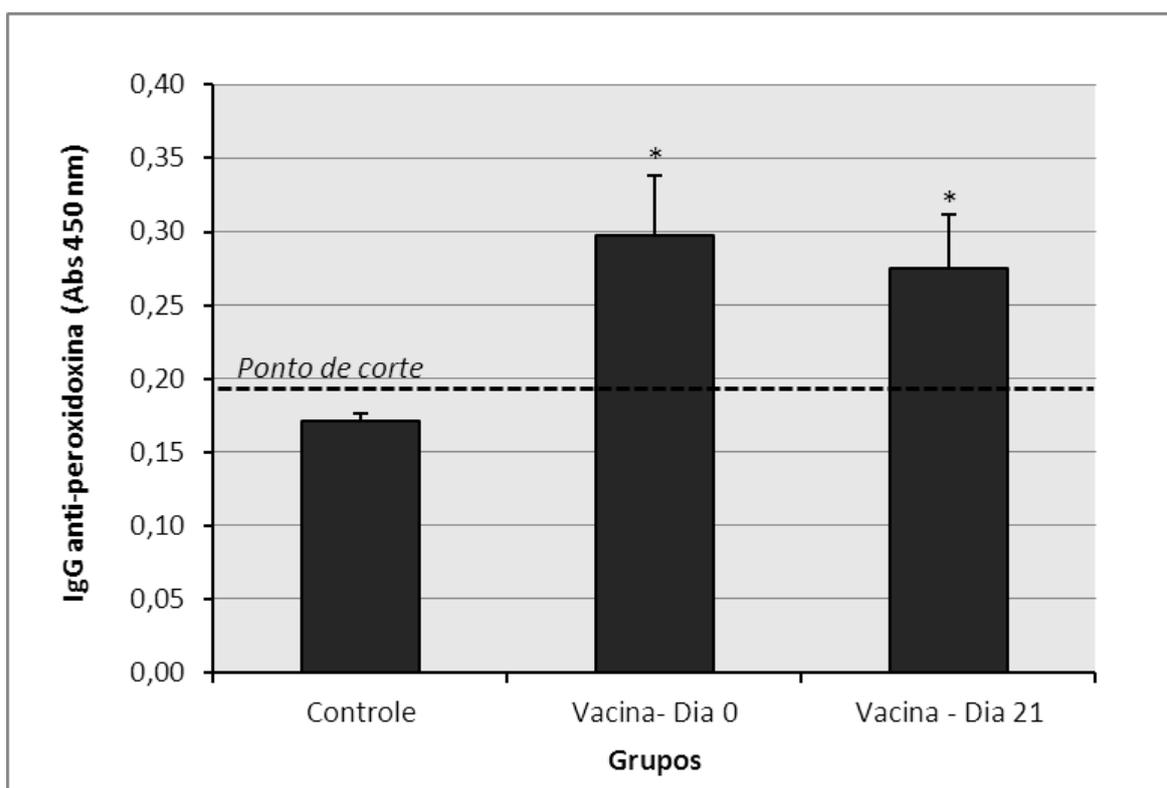
**Figura 13.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina em ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

\* $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo controle (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

# $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo adjuvante (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

#### 6.4.2. Persistência dos níveis de IgG anti-peroxidoxina maternos

Na Figura 14 estão comparados os níveis de anticorpo IgG anti-peroxidoxina maternos no dia 0 dia de lactação (21 ° dia de gestação) que corresponde a 7 dias após último reforço e no 21° dia de lactação (dia do desmame) que corresponde a 28 dias após último reforço. Não houve alteração nos níveis de anticorpos neste período entre os grupos vacinados, que apresentaram níveis de IgG superiores ao grupo não vacinado em ambos os momentos.

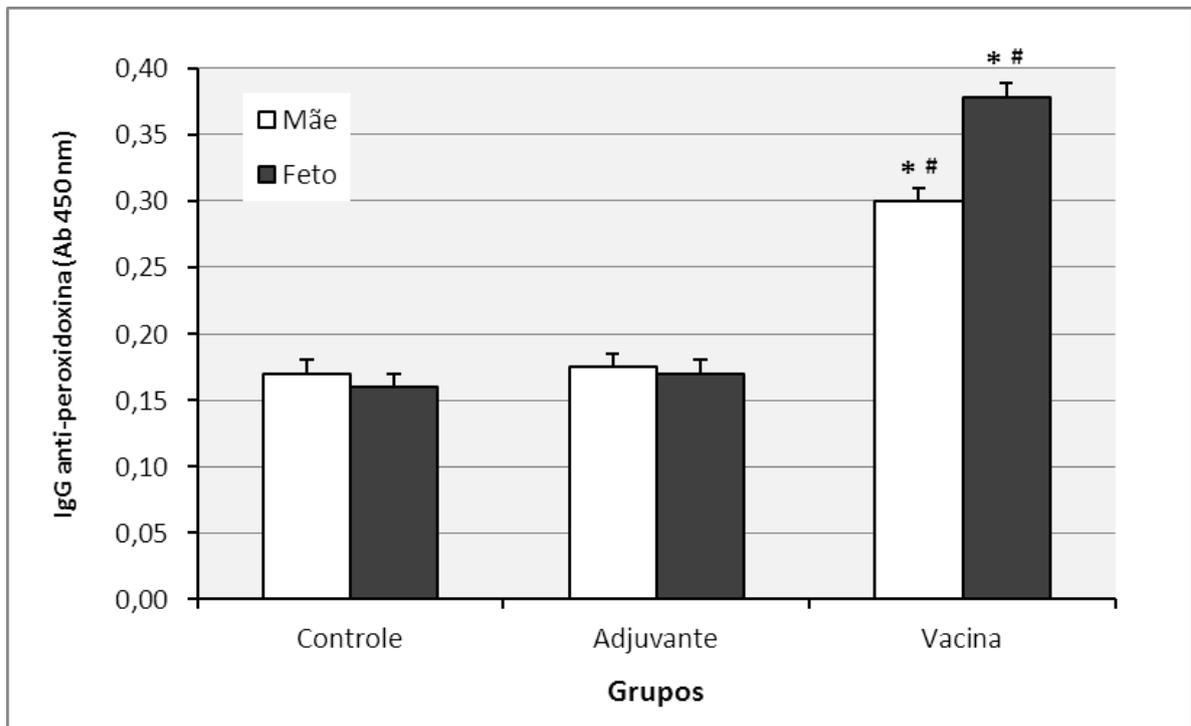


**Figura 14.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina em ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina nos dias 0 e 21 de lactação.

\* $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo controle (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

### 6.4.3. Transferência de imunidade via placenta

A Figura 15 compara os níveis de IgG anti-peroxidoxina no soro (diluição 1:100) materno (21º dia de prenhez) e de seus respectivos fetos (dia 0 de nascimento). Os valores da densidade óptica de IgG anti-peroxidoxina foram estatisticamente superiores nas mães e nos fetos do grupo vacina em relação ao grupo controle e adjuvante.



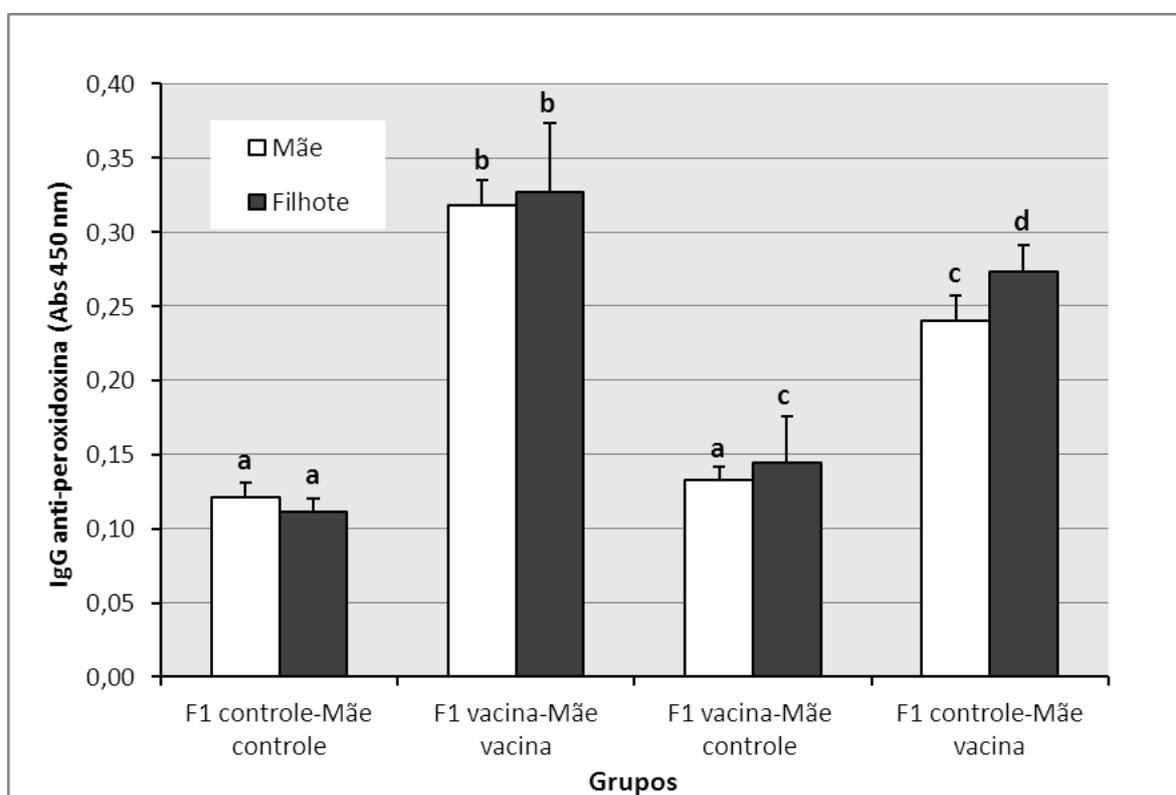
**Figura 15.** Detecção de IgG anti-peroxidoxina materna e fetal de ratas que receberam salina (Controle), MPL (Adjuvante) ou Vacina durante a prenhez.

\* $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo controle (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

# $p < 0,05$  – diferença significativa em relação ao grupo adjuvante (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

#### 6.4.4. Transferência de imunidade via aleitamento

A Figura 16 apresenta os níveis de IgG anti-peroxidoxina no momento do desmame (21º dia de lactação) nos soros de mães e filhotes. Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa nos níveis de IgG anti-peroxidoxina entre mãe e filhote. Os grupos F1vacina-Mãe vacina e F1controle-Mãe vacina apresentaram aumento nos valores nos níveis de IgG anti-peroxidoxina materno e fetal comparados aos grupos F1controle-Mãe controle e F1vacina-Mãe controle. Os níveis de IgG anti-peroxidoxina fetal no grupo F1vacina-Mãe controle aumentou em relação ao grupo F1controle-Mãe controle. Houve diminuição nos níveis de IgG no F1controle-Mãe vacina comparado ao F1vacina-Mãe vacina.

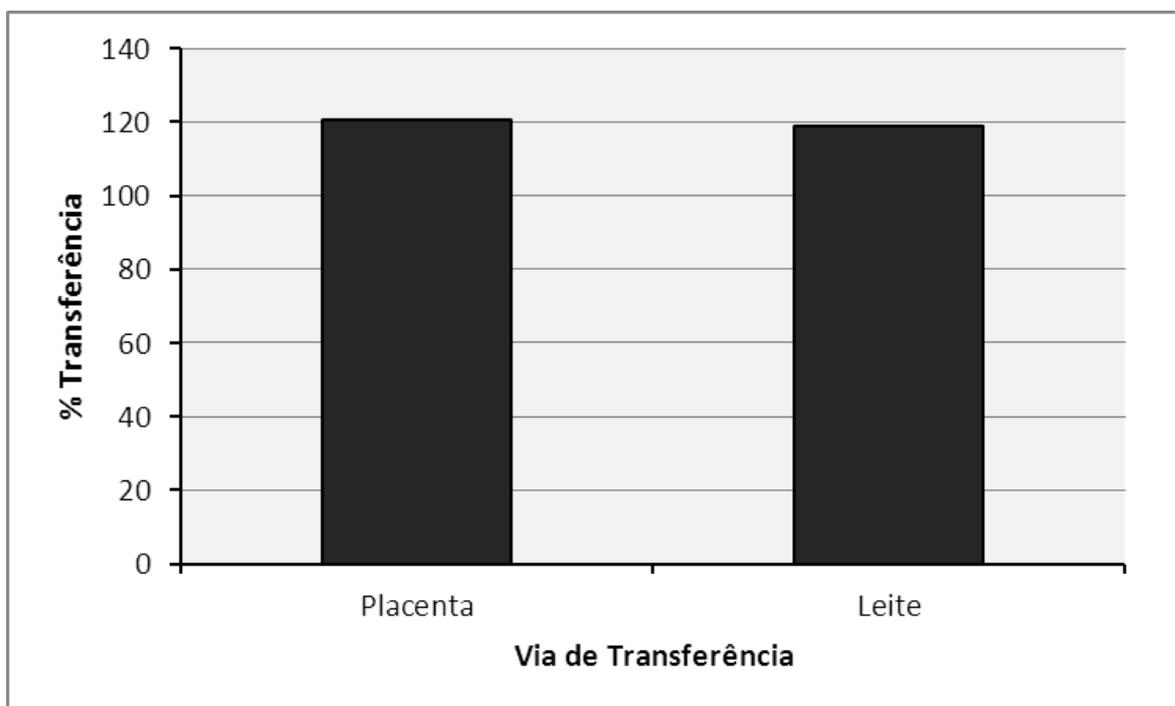


**Figura 16.** Médias e desvios-padrão da quantificação de IgG anti-peroxidoxina materna e fetal no dia 21 de lactação de ratas que receberam salina (Controle) ou MPL + peroxidoxina recombinante (Vacina) durante a prenhez.

*<sup>a,b,c,d</sup>p < 0,05 – letras diferentes diferem significativamente entre os grupos (Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls).*

#### 6.4.5. Índice de Transferência de Imunidade

A Figura 17 ilustra as taxas de transferência passiva de anticorpos IgG anti-peroxidoxina via placenta e aleitamento. Os resultados sugerem que a transferência de imunidade foi semelhante nas duas vias.

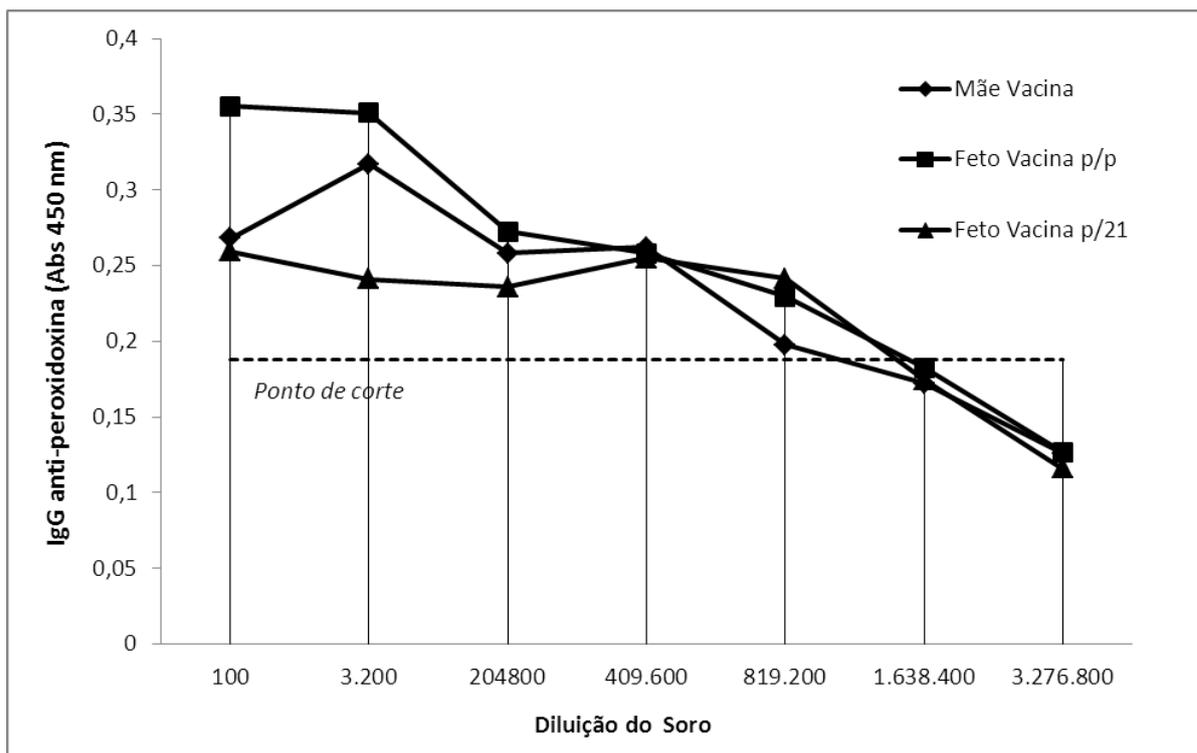


**Figura 17.** Porcentagem da taxa de transferência passiva de anticorpos IgG anti-peroxidoxina via placenta e leite de ratas que receberam vacina durante a prenhez.

$p > 0,05$  – *Teste Exato de Fisher.*

### 6.4.6 Titulação de IgG

A Figura 18 apresenta os valores de absorvância de IgG anti-peroxidoxina dos soros de animais imunizados em função da diluição dos soros, quando a placa foi sensibilizada com solução antígeno a  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e o conjugado anti-IgG foi diluído 1:2000. O soro foi considerado positivo até a diluição de 1:819.200.



**Figura 18.** Titulação de IgG anti-peroxidoxina de ratos que receberam vacina durante a prenhez e em seus filhotes.

## 7. DISCUSSÃO

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, sendo consideradas pela Organização Mundial de Saúde, em conjunto, como uma das seis mais importantes doenças tropicais de países em desenvolvimento (WHO, 2004; DESJEUX, 2004; ALVAR *et al.*, 2012). O controle da doença no Brasil se faz principalmente por meio do controle das populações do inseto vetor e da eliminação dos reservatórios da doença, representado pelos cães infectados. Entretanto, há uma grande falha no controle da doença em função da ausência de uma vacina eficaz e de testes diagnósticos acurados (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004; CHAPPUIS *et al.*, 2007; BOELAERT *et al.*, 2007). Nesse contexto, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Ricardo Fujiwara (UFMG), utilizando metodologias de mineração de dados na área de imunogenômica, vem selecionando epítomos conservados entre as espécies de *Leishmania*, e divergentes nos ortólogos presentes nos hospedeiros *Homo sapiens* e *Canis familiaris*, com o intuito de desenvolver vacinas e testes de diagnóstico para múltiplas leishmanioses (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014a,b; 2015a,b). Dentre as vacinas, destaca-se a peroxidoxina de *Leishmania V. braziliensis*, que, associada ao adjuvante MPL, foi empregada nesse trabalho.

A peroxidoxina é uma proteína com função antioxidante, particularmente relevante para *Leishmania*, já que estas invadem e se proliferam no interior de fagolisossomas de fagócitos, local com alta expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são mediadores que reagem prontamente com diversos tipos de moléculas, como proteínas, DNA e lipídios, e têm sido implicados numa grande variedade de processo celulares, tais como transdução de sinal, homeostase do sistema redox, apoptose, envelhecimento celular, progressão de tumores e mecanismos de resposta efetora contra patógenos (HARDER *et al.*, 2006).

Devido as peroxidoxinas serem altamente conservadas em *Leishmania sp*, associado ao fato da prevalência de mais de uma espécie de *Leishmania* em áreas endêmicas, o uso dessa proteína como antígeno vacinal poderia gerar uma imunidade protetora contra espécies responsáveis pelas formas cutâneas e visceral da leishmaniose. Trabalhos anteriores tem descrito antigenicidade contra peroxirredoxinas de espécies de *Leishmania*, tanto em infecções em humanos como em cães (COSTA *et al.*, 2011; SANTAREM *et al.*, 2010; TODOLI *et al.*, 2009).

No Brasil, principalmente em áreas urbanas e periurbanas, o aparecimento de leishmanioses entre gestantes começa a tornar-se mais freqüente (MORAES *et al.*, 1995; VIANA *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2003; CALDAS *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2008). É de consenso desses autores que durante a gestação, as manifestações clínicas, tanto da LV quanto da LT, são mais graves e acentuadas e elevam as taxas de morbimortalidade materna e fetal. Ainda existe discussão quanto à toxicidade das drogas utilizadas para o tratamento das leishmanioses durante a gestação, e os medicamentos disponíveis não são considerados seguros para o uso durante a gravidez (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2008).

A administração de vacinas no período gestacional poderia ser uma intervenção com grande potencial na prevenção de doenças. Na mãe seria eficaz por proteger a gestante e, na criança, por receber anticorpos maternos num momento em que não poderia responder adequadamente aos estímulos vacinais. Portanto, a estratégia de vacinar as gestantes, principalmente em países pobres, poderia prevenir doenças em lactentes menores de 3 meses (TAVARES *et al.*, 2011).

Para avaliação e diagnóstico da toxicidade sistêmica deve-se levar em consideração a diminuição da massa corporal dos animais, alteração no desenvolvimento ponderal, no consumo de água e ração, assim como o aparecimento de alterações comportamentais e físicas, como apatia, movimentos estereotipados, prostração, pelos arrepiados, além de alterações na massa relativa dos órgãos (MANSON e KANG, 1994; CHAHOUD *et al.*, 1999; MELLO, 2001; DAMASCENO *et al.*, 2002a). Seguindo o mesmo protocolo experimental deste estudo, MORAES-SOUZA (2015) não observou alterações nos parâmetros ou qualquer sinal clínico de toxicidade sistêmica.

A toxicidade reprodutiva pode ocorrer devido a qualquer interferência causada por alguma substância nas capacidades reprodutivas de machos e fêmeas, incluindo o período pré-natal e pós-natal (NEUBERT *et al.*, 1992). Dependendo do período de gestação nos quais os agentes entram em contato com o organismo materno, essa exposição pode resultar em diferentes respostas que variam desde um efeito anti-implantação, alterações funcionais ou morfológicas, retardo geral de desenvolvimento, incidência de malformações até letalidade (DAMASCENO *et al.*, 2008b). Todos os animais do presente trabalho apresentaram prenhez a termo, e este resultado demonstra que a vacina não apresentou dose letal para as fêmeas prenhes.

Sabe-se que o índice de implantação correlaciona-se com o número de corpos lúteos, sendo este um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (FORD,

1982). Dado que existe uma correlação entre o número de corpos lúteos e o número de ovulações, é habitual que o primeiro também seja correlacionado com o número de pré-embriões (ORTIZ, VILLALÓN e CROXATTO, 1979), pois se pressupõe que cada ovulação libera um ovócito que pode ser fecundado e viabilizar-se em um pré-embrião. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao número de corpos lúteos. Este resultado já era esperado, uma vez que adjuvante e vacina foram administrados somente no dia 0 de prenhez, ou seja, após a ovulação. Além do número de corpos lúteos também não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de implantações, e consequentemente porcentagem de perdas pré-implantação. Esses parâmetros são utilizados para verificar o efeito de determinado fator ambiental no período de pré-implantação (dia 0 ao 4º da prenhez), ou seja, verificar o efeito anti-implantação de fatores ambientais (DAMASCENO *et al.*, 2008b).

Neste estudo observou-se um aumento da porcentagem de perdas pós-implantação no grupo vacina em relação aos demais grupos. Dentre os diversos fatores imunológicos que levam ao sucesso da gestação está a modulação para a resposta imunológica do tipo T helper 2 (Th2) (LIN *et al.*, 1993; MARZI *et al.*, 1996; MICHELON *et al.*, 2006; SARAFANA *et al.*, 2007). Como o embrião se comporta no organismo materno como um enxerto semi-alogênico, estando vulnerável às teorias de rejeição e intolerância imunológica, essa modulação para a resposta do tipo Th2 é essencial. A imunização experimental com outros antígenos de *Leishmania spp* foi capaz de induzir proteção associados à resposta imune Th1, caracterizada por altos níveis de IFN- $\gamma$ , bem como reduzida produção de IL-4 e IL-10 em animais imunizados (GHOSH *et al.*, 2001; GHOSH *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2003; COELHO, 2004; MORENO *et al.*, 2012. Isso nos faz supor que o mesmo perfil de resposta Th1 tenha sido estimulada pela vacina de peroxidoxina recombinante, o que provavelmente provocou um desvio do balanço Th1/Th2 proposto para o sucesso gestacional, e as perdas pós-implantação observadas nesse trabalho.

De acordo com a Organização PanAmericana de Saúde, o uso de substâncias exógenas durante a gestação é um dos fatores de risco, tanto ambiental quanto comportamental, que pode comprometer o crescimento fetal intra-uterino. KHERA (1985) demonstrou que quaisquer alterações no organismo materno podem perturbar o desenvolvimento embrionário. CHERNOFF *et al.* (2008) afirma que toxicidade materna pode causar restrição de crescimento intra-uterino (RCIU). O diagnóstico de RCIU ocorre através da comparação de fetos considerados saudáveis (vindos de gestação sem patologias

conhecidas) com fetos que apresentam algum tipo de alteração ou advindos de gestações com algum problema (FESCINA, 2011). Não houve diferença nos pesos fetais entre os grupos experimentais, mostrando que a vacina e/ou adjuvante não causaram influência sobre esse parâmetro. Da mesma forma, a classificação dos pesos fetais para a idade de prenhez (PIP, AIP e GIP) foi semelhante entre os grupos, confirmando que o tratamento não causou alteração no peso fetal na dose testada.

O peso das placentas e a eficiência placentária foram semelhantes entre os grupos experimentais. A eficiência placentária é uma medida para confirmar a capacidade placentária de garantir as trocas materno-fetais e o suprimento nutricional ao feto em desenvolvimento (FOWDEN *et al.*, 2009). O bom funcionamento da placenta, que não foi afetada pelo tratamento, contribuiu para o adequado desenvolvimento fetal.

Além do peso, a avaliação dos centros de ossificação dos fetos é importante para determinação do estágio de maturidade fetal ao nascimento. Aliverti *et al* (1979) propuseram o estudo dos centros de ossificação nos fetos de ratas, pois estes seriam os pontos mais afetados em fetos imaturos. A análise dos centros de ossificação dos fetos, obtidos de ratas tratadas com vacina e/ou adjuvante, mostrou que o tratamento não influenciou na maturidade esquelética fetal. Chahoud e Paumgarten (2005) verificaram forte correlação entre o peso corporal e grau de ossificação, o que pode ser observado em nosso estudo.

A análise da incidência de anomalias externas, esqueléticas e viscerais foi realizada em 397 fetos. Foram observados alguns casos esporádicos de anomalias externas nos recém-nascidos, como fetos com gastrosquise e hipoplasia caudal. Como não houve diferenças estatísticas no número total das anomalias externas, essas observações foram consideradas espontâneas e não relacionadas com o tratamento. Também não houve alteração na frequência de anomalias esqueléticas, sendo observado somente aumento significativo na ossificação incompleta do esternóbrio dos fetos do grupo adjuvante e diminuição de esternóbrios assimétricos nos fetos do grupo vacina. Essas anomalias esqueléticas encontradas neste estudo são consideradas como variações (CHAHOUUD *et al.*, 1999). Anomalias classificadas como variações são aquelas que não afetam a sobrevivência ou saúde, e podem desaparecer na fase pós-natal. Isto pode incluir um atraso no crescimento ou morfogênese. As anomalias classificadas como malformações são as que causam mudanças estruturais permanentes, que são susceptíveis de afetar negativamente a sobrevivência ou a saúde das espécies sob investigação (CHAHOUUD *et al.*, 1999.; SOLECKI *et al.*, 2012). Uma vez que não houve alteração no total da frequência

de anomalias esqueléticas, essas alterações podem ser consideradas como variações transitórias.

O grupo adjuvante não apresentou alteração na frequência de anomalias viscerais. O adjuvante MPL, um derivado não tóxico de lipolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota* é considerado um produto seguro e bem tolerado, licenciado em alguns países para uso humano (RAVINDRAN *et al.*, 2010). A atividade adjuvante do MPL é atribuída principalmente a sua capacidade de interagir com TLR-4 nas APC's induzindo a cascata de citocinas pró-inflamatórias. Vários estudos têm demonstrado a capacidade do MPL de ativar monócitos e macrófagos, sendo que através da ativação destas células, antígenos vacinais são mais facilmente fagocitados, processados e apresentados (SINGH; O'HAGAN, 2002). Vários estudos estabeleceram a segurança e eficácia deste adjuvante (AFRIN e ALI, 1997; BALDRICK *et al.*, 2001; BHOWMICK e ALI, 2009). Em nosso estudo, como não houveram alterações na performance reprodutiva materna e nos parâmetros fetais, podemos inferir que o adjuvante é seguro na gestação.

Ainda com relação às anomalias viscerais, foi verificado que o grupo vacina apresentou aumento na frequência do total de anormalidades viscerais. – A hidronefrose foi a anormalidade predominante neste grupo, sendo esta anomalia considerada uma malformação (CHAHOUUD *et al.*, 1999.; SOLECKI *et al.* 2003). Trata-se da dilatação da pelve renal, demonstrando que há um bloqueio ao fluxo da urina ao nível da junção pieloureteral ou uretero-vesical (PETERS *et al.*, 2012). A obstrução do trato urinário é causa de 9,3% das insuficiências renais agudas *no* período neonatal (MIKLOVICOVA *et al.*, 2008)

Uma ação perturbadora sobre a proliferação, migração ou diferenciação celular pode induzir uma cascata de efeitos que culminam nas anomalias do desenvolvimento. Processos teratogênicos em tecidos embrionários incluem alterações metabólicas e sistemas de sinalização (ERIKSSON, 2009), como metabolismo do inositol (HOD *et al.*, 1990), a via poliol (ERIKSSON *et al.*, 1986), o ácido araquidônico/prostaglandinas (PINTER *et al.*, 1986; GOLDMAN & GOTO, 1991) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (HAGAY *et al.*, 1995, DAMASCENO *et al.*, 2002). Talvez a proteína atue em alguma via do desenvolvimento, modificando a atuação dos sinalizadores embriológicos, principalmente na formação do sistema renal. Mais estudos são necessários para elucidar este achado.

A principal vantagem da vacina de proteínas recombinantes é que, assim como as vacinas atenuadas, ela induz resposta imune celular, tanto de linfócitos T auxiliares, quanto

T citotóxicos e a produção de anticorpos (VAN TIENHOVEN *et al.*, 2001; NAGATA *et al.*, 2004). Este trabalho mostrou que a vacina utilizada conseguiu estimular a produção de anticorpos da classe IgG específicos para proteína peroxidoxina recombinante nos animais vacinados. Outros estudos também demonstraram resultados semelhantes, onde antígenos protetores induziram altos títulos de IgG (BAYIH *et al.*, 2014; CAMPOS-NETO *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2014; GURUNATHAN *et al.*, 1997; SKEIKY *et al.*, 2002).

Há um consenso geral de que as células T e a imunidade mediada por células contribuem para a patogênese das diferentes formas de leishmaniose. Embora estudos avaliem a resposta humoral tanto na LV como na LT, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra *Leishmania* (TRUJILLO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2005). No entanto, entre outras funções, a imunoglobulina G (IgG) antígeno-específica é responsável pela opsonização de patógenos, para que componentes do sistema imune inato os reconheçam como estranhos (JONES *et al.*, 1998; COLMENARES *et al.*, 2002).

Sabe-se que a *Leishmania sp* é um parasito intracelular que sobrevive no interior de fagócitos, principalmente monócitos, graças a sua capacidade de suprimir a resposta de tais células à infecção. Os mecanismos envolvidos na sobrevivência são relacionados à suas moléculas de superfície e tem como resultado a inibição da fusão dos fagossomos onde sobrevivem aos lisossomos, supressão da síntese de NO, bem como interromper vias de sinalização celular para ativação de resposta imunológica (CUNNINGHAM, 2002; WEI *et al.*, 1995; DESCOTEAUX e TURCO, 1999; SORENSEN *et al.*, 1994). No entanto, quando um parasito fagocitado é incapaz de suprimir as respostas imunes, os fagócitos atuarão no reconhecimento do patógeno, na ativação de resposta imunológica adquirida, bem como células efetoras na eliminação do parasito. A primeira etapa da fagocitose é o reconhecimento dos patógenos por meio de receptores específicos, que podem ser receptores de padrão, como os receptores do tipo Toll, ou receptores que reconhecem parasitos opsonizados, seja por proteínas do complemento ou por anticorpos. Dentre estes receptores estão aqueles que reconhecem cadeias pesadas de IgG, denominados receptores Fc $\gamma$ , por exemplo o Fc $\gamma$ RII, também denominado CD32. O CD32 é expresso na superfície de monócitos e está relacionado a fagocitose de partículas opsonizadas. (NIMMERJAHN e RAVETCH, 2008). Após a fagocitose, ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo, dando continuidade à atividade microbicida, por meio de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; SEGAL, 2005; SERBINA *et al.*, 2008; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). Entretanto, alguns estudos têm

indicado que a presença de anticorpos IgG pode ser desfavorável na proteção contra a leishmaniose. Quando a superfície de amastigotas de *Leishmania* está recoberta por anticorpos do tipo IgG, o imunocomplexo resultante permite sua ligação aos receptores Fc de macrófagos ativados, preferencialmente induzindo a produção de altas quantidades de IL-10 (MOSSER e ZHANG, 2008). Caso seja detectado o aumento da expressão de IL-10 em decorrência deste mecanismo, ele pode indicar o direcionamento da resposta para o tipo Th-2. Sendo assim, novos estudos que possam elucidar a participação dos anticorpos antígeno-específicos no processo de imunização são necessários.

Outra abordagem do projeto foi avaliar se a imunidade conferida pela vacina de peroxidoxina recombinante de *L. braziliensis* administrada durante a prenhez pode ser transferida para a prole via placenta ou aleitamento. Observou-se uma eficiente transmissão de anticorpos IgG anti-peroxidoxina, tanto pela placenta, quanto pelo aleitamento, reveladas pela taxa de transferência de anticorpos IgG acima de 100%, nos dois casos. Esses dados estão de acordo com o que tem sido relatado para ratos e murganhos (GITLIN e GITLIN 1974; ZHIZHEN *et al.*, 2012; YOSHIKAZU HONDA-OKUBO *et al.*, 2014). Ao contrário de muitos mamíferos de outras espécies, nas quais a passagem de imunoglobulinas maternas ao recém-nascido é verificada na fase pós-natal, através do colostro, nos ratos, pelo fato desta espécie possuir estrutura placentária de natureza hemoendotelial, apresentando camadas de pequena espessura, a transmissão de imunoglobulinas maternas para o filhote se processa com relativa facilidade. Estrutura placentária semelhante é apresentada também pela espécie humana, o mesmo verificando-se entre outros mamíferos que têm placenta do tipo hemocorial, como nos primatas e outros roedores. Esta estrutura permite que os anticorpos, atravessando a barreira placentária, atinjam, no sangue fetal, concentrações iguais ou superiores ao do sangue materno (FURUTA *et al.*, 1982; RUCKEBUSCH *et al.*, 1991; SIMISTER e STORY, 1997). Segundo MUSSI-PINHATA e REGO (2005), o transporte ativo de IgG através da placenta inicia-se precocemente e vai aumentando proporcionalmente até o termo gestacional, mostrando que a idade gestacional influencia nos níveis de IgG totais do cordão umbilical.

Os níveis de IgG totais detectados nos neonatos a termo, no presente trabalho, foi exatamente 20% superior aos níveis maternos. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos na literatura (SALIMONU *et al.*, 1978; CARVALHO *et al.*, 1988; NAGAO *et al.*, 1999 e 2001). Entretanto, essa imunidade parece ser breve, visto que, recém-nascidos de ratas vacinadas, que receberam anticorpos anti-peroxidoxina via

placentária, quando amamentados por ratas controle, já não apresentavam mais anticorpos detectáveis no 21º dia de nascimento. Estes dados estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura (ZHIZHEN *et al.*, 2012; YOSHIKAZU HONDA-OKUBO *et al.*, 2014).

Por outro lado, os filhotes que foram amamentados por suas mães biológicas (vacinadas), mantiveram anticorpos detectáveis no 21º dia de vida. Em roedores, o leite materno é uma importante via de transferência passiva de imunidade, com predominância de IgG em relação à IgA (GHETIE e WAARD, 1997). Os anticorpos presentes no leite são transferidos à circulação do neonato através dos receptores FcRn expressos pelas células do epitélio intestinal (GHETIE e WAARD, 1997). Nesse trabalho não foi mensurado os níveis de anticorpos IgG anti-peroxidoxina nos filhotes após o desmame, mas segundo ZHIZHEN *et al.* (2012), assim como os anticorpos transferidos via placentária, anticorpos adquiridos através do leite materno também declinam rapidamente.

## **8. CONCLUSÕES**

Baseados nos resultados deste trabalho é possível concluir que a vacina composta pela peroxidoxina recombinante *de Leishmania braziliensis* é potencialmente imunogênica quando administrada no período gestacional, sendo a imunidade materna efetivamente transferida para a prole, tanto por via placentária, quanto pelo aleitamento materno. No entanto, a composição vacinal aumentou as taxas de perdas embrionárias pós-implantação, além de aumentar a frequência de anomalias viscerais, mostrando que sua utilização durante a gestação exige cuidado e maiores estudos.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

1. Avaliar as repercussões fetais da vacina de peroxidoxina recombinante administrada durante a prenhez de animais infectados por *Leishmania braziliensis*, para verificar se os potenciais benefícios superam os riscos;
2. Avaliar o perfil de resposta (Th1/Th2) induzido pela vacina;
3. Verificar se a transferência de imunidade é consequência da transferência de anticorpos ou antígenos;
4. Avaliar o efeito de outras vacinas administradas durante o período gestacional.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Ada G, Ramshaw I 2003. DNA vaccination. *Expert Opin Emerg Drugs* 8: 27-35.
- Afrin F, Ali N 1997. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun*, 65:2371-2377.
- Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E; Leone VG, Mariani L, Prati M, Vismara C 1979. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratol* 20:237-242.
- Almeida-Silva L 2002. Estudo Prospectivo de Indivíduos com Testes Imunológicos e Reação em Cadeia da Polimerase para Calazar em Porteirinha, Minas Gerais, Brasil, MSc Thesis, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7 (5) e-35671, 1-11.
- Argenzio A 1984. Digestão, absorção e metabolismo. In: SWENSON, M.J. *Dukey's Fisiologia dos animais domésticos*. 10th ed. Ithaca: Cornell University Press, cap.3, p.263-264.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30:1269-1281.
- Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 14:523-532, 1996.
- Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, Costa DL, Holanda TA, Soares VYR, Biá M, Caldas AJM, Romero GAS, Rabello A 2008. Validation of the Rapid Immunochromatographic Test IT-LEISH® for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 17(2):107-116
- Badilla X, Morice A, Avila-Aguero ML, Saenz E 2007. Fetal risk associated with rubella vaccination during pregnancy *Pediatr Infect Dis J*, 26(9):830-835
- Baldrick P, Richardson D, Elliott G, Wheeler AW 2002. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol*.35:398-413.
- Barr SD, Gedamu L 2001. Cloning and Characterization of Three Differentially Expressed Peroxidoxin Genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *J Biol Chem*. 276:34279-34287
- Baxter D 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med* 57:552-556, 2007.
- Bailey MS, Lockwood DNJ 2007. Cutaneous leishmaniasis *Clinics in Dermatology* 25, 203 – 211
- Bayih AG, Daifalla NS, Gedamu L 2014. DNA-Protein Immunization Using *Leishmania* Peroxidoxin-1 Induces a Strong CD4<sup>+</sup> T Cell Response and Partially Protects Mice from Cutaneous Leishmaniasis: Role of Fusion Murine Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor DNA Adjuvant. *PLoS Negl Trop Dis* 8(12): e3391

- Bergquist NR 1998. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem Inst Osw Cruz*, 93: 95-101.
- Bhowmick S, Ali N 2009. Identification of novel *Leishmania donovani* antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. *PLoS One*, 4 (6) e5820.
- Boehme CC, Hain U, Novosel A, Eichenlaub S, Fleischmann E, Löscher T 2006. Congenital visceral leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*. 12(2): 359-60.
- Boelart M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Mondal D, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Peeling RW 2007. Evaluation of Rapid Diagnostic Tests: Visceral Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, S30-S39.
- Bogdan C, Rollinghoff M 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-134
- Borja-Cabrera GP. 2002. Análise do potencial diagnóstico, prognóstico e imunoprotetor do antígeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania (L.) donovani*, no calazar canino experimental e de área endêmica. PhD Thesis. Post-Graduate Program in Experimental Pathology. Federal Fluminense University. Niteroi. Rio de Janeiro, Brasil.
- Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M, Acquafredda A, Fumarola L, Leogrande D 2000. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parasitol* 42 (3-4), 183-190.
- Brasil 2001. Manual de Normas de Vacinação. 3.ed. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 72p.
- Brasil, 2006 Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 120p.
- Brasil 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 62p.
- Caldas AJ, Costa JML, Gama MEA, Ramos EAG, Barral, A 2003. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report. *Acta Trop* 88: 39-43.
- Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG 2002. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 70(6):2828-36.
- Cardoso SRA, Silva JCF. ; Costa RT, Mayrink W, Melo MN, Michalick MSM, Liu IAW, Fujiwara RT, Nascimento E 2003.. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin). *Rev Soc Bras Med Trop Bras*, 36 (22202): 193-199.
- Carvalho BTC, Vieira HMS, Carbonare SB, Ribeiro MA, Grisardi N, Carneiro-Sampaio MMS 1988. Niveles de inmunoglobulinas y lisozimas e sangre de cordón umbilical en recién nacidos de diversas edades gestacionales. *Rev Latinoam Perinatol* 8:98-105.
- Castro H 2002. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Medic* 33 (11): 1552 -1562,

- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, 1937. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 33: 189-229.
- Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 13: 375-381
- Chahoud I, Paumgarten FJR 2005. Relationships between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification *Braz J Med Biol Res* 38(04) 565-575.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5(11):873-82.
- Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM 2008. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the "no observed adverse effect level". *Reprod Toxicol* 25(2):192-202.
- Coelho EAF, Tavares ACP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazinelli RT, Fernandes AP 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* 71(7): 3988–3994.
- Coitinho JB, Costa DM, Guimaraes SL, de Goes AM, Nagem RA 2012. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of NahF, a salicylaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* G7 involved in naphthalene degradation. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 68, 93-97.
- Coler RN, Reed SG 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(5): 244-249.
- Coler RN, Yasir A, Skeiky W, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornelliso CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG 2002. Immunization with a Polyprotein Vaccine Consisting of the T-Cell Antigens Thiol-Specific Antioxidant, *Leishmania major* Stress-Inducible Protein 1, and *Leishmania* Elongation Initiation Factor Protects against Leishmaniasis. *Infect Immun* 70(8):4215-4225.
- Colmenares M, Constant SL, Kima PE, McMahon-Pratt D 2002. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun* 70:6597–605.
- Costa N, Peters NC, Maruyama, SR 2011. Vaccines for the Leishmaniases: Proposals for a Research Agenda. *Plos Neg. Trop. Dis* 943(5):1-9.
- Costa HF, Babboni SD, Rodrigues CFC, Padovani CR, Dutra IS, Modolo JR 2012. Kinetics of colostral antibodies against epsilon toxin produced by *Clostridium perfringens* type D in lambs. *Pesq Vet Bras*, 32(1): 17-21.
- Couter AR, Cox JC, 1997. Adjuvants-a classification and review of their modes of action. *Vaccin* 15(3):248-256.
- CUNHA-NETO E 1999. MHC-restricted antigen presentation and recognition: constraints to gene, recombinant and peptide vaccines in humans. *Braz. J Med Biol Res* 32: 199-205.

- Cunningham AC 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72:132–41.
- Daher S, Mattar R, 2009. Gestação: um fenômeno imunológico?/ Pregnancy: an immunological phenomenon? *Rev Bras Alergia Immunopat* 32(2): 63-67.
- Dally A 1998. Thalidamide: was the tragedy preventable? *Lancet* 351:1197-1199.
- Damasceno DC, Volpato GT, Lemonica IP 2002. A review of antifertility folkloric plants tested in laboratory animals. *Rev Bras Plan Med* 5(1) 19-26.
- Damasceno DC, Volpato GV, Ferrari C, Roldan LB, Souza MSS 2008(a) Effect of indomethacin on the pregnant rat. *Braz Arch Biol* 51: 79-85.
- Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC Paumgarten FJR 2008(b). Anomalias Congênitas: Estudos Experimentais. Coopmed: Belo Horizonte, 106 p.
- Dantas-Torres F 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol* 141: 1–8.
- De Vos AJ, Bock RC 2000. Vaccination against bovine babesiosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 916: 540-545.
- Coler RN, Reed SG 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(5): 244-249
- Deane LM, Deane ME 1955. Observações preliminares da importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar. *O Hospital*, 48:61-67.
- Descoteaux A, Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1455, 341–352.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Com Immunol Microbiol Infect Dis* .27: 305-318.
- Duthie MS, Ramanv S, Piazza FM, Reed, SG, 2012. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine* 30: 134– 141.
- Duxbury RE, Sadun EH 1964. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 13(4): 525-29.
- Elahi, S, Buchanan RM, Babiuk LA, Gerdt V 2006. Maternal Immunity Provides Protection against Pertussis in Newborn Piglets. *Infect Immun* 74(5):2619-2627.
- Ellis S 2004. The cattle major histocompatibility complex: is it unique? *Vet Immunol and Immunopathol* 102: 1-8.
- Eriksson UJ, Naeser P, Brolin SE 1986. Increased accumulation of sorbitol in offspring of manifest diabetic rats. *Diabetes* 35(12):1356-63.
- Eriksson UJ 2009 Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2):85-93
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende DM, Hermont V, Abrantes CF, Gazzinelli RT. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26: 5888-5895

- Fernandes CB, Junior JT de Jesus C, Souza BM, Larangeira DF, Fraga DB, Tavares Veras PS, Barrouin-Melo SM 2014. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine* 32(11):1287–1295.
- Fescina RH, De Mucio B, Durán P, Martínez G 2011. El hogar materno: descripción y propuesta para su instalación. 2a ed. Montevideo: CLAP/SMR 1585, 12p.
- Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL 2004. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 12:31-40.
- Figueiró-Filho EA 2005. Leishmaniose visceral e gestação: relato de caso. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27(2):92-97.
- Figueiró-Filho EA, Beitune PEL, Queiroz GT, Somensi RS, Morais NO, Dorval MEC 2008. Visceral leishmaniasis and pregnancy: analysis of cases reported in a central-western region of Brazil. *Arch Gynecol Obstet* 278(1):13-16.
- Fiuza JA, Gannavaram S, Santiago HC, Selvapandiyam A, Souza DM, Passos LSA, Mendonça LZ, Lemos-Giunchetti DS, Ricci ND, Bartholomeu DC, Giunchetti RC, Bueno LL, Correa-Oliveira R, Nakhasi HL, Fujiwara RT 2015. Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine* 1;33(2):280-8.
- Flohé L, Budde H, Bruns K, Castro H, Clos J, Hofmann b, Kansal-Kalavar S, Krumme D, Menge U, Plank-Schumacher K, Sztajer H, Wissing J, Wylegalla C, Hecht HJ 2002. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 397(2):324-35.
- Ford WCL 1982. The effect of deoxy-6-fluoroglucose on the fertility of male rats and mice. *Contraception* 25: 535-545.
- Fowden AL, Forhead AJ 2009. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res.* ;72(5):257-265.
- Freund J, Casals J, Hosmer, EP 1937. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol* 37:509-513.
- Fujiwara RT, Bethony J, bueno LL, Wang Y, Ahn SY, Samuel A, Bottazzi ME, Hotez P, Mendez S 2005. Immunogenicity of the Hookworm Na-ASP-2 Vaccine Candidate: Characterization of Humoral and Cellular Responses after Vaccination in the Sprague Dawley Rat. *Human Vaccines* 1(3):123-129.
- Furuta JA, Rosa RR, Oliveira EPT, Iizuka, H 1982. Quantificação de anticorpos diftéricos em cobaias – Persistência do título de anticorpos séricos em animais inoculados com uma dose de toxóide diftérico. *Ver Saúde Publ* 16 (2): 97-106.
- Genaro O 2000. Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, editores. *Parasitologia Humana*. 10ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 56-72.
- Ghetie V, Ward ES 1997. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter *Immunol Today* 18(12):592-8.
- Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G 2001. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine* 19:3169-3178.

- Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G 2002. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* 20: 59–66
- Gitlin JD, Gitlin D 1974. Protein binding by specific receptors on human placenta, murine placenta, and suckling murine intestine in relation to protein transport across these tissues. *J Clin Invest* 54(5):1155-1166.
- Giunchetti RC, Reis AB, Silveira-Lemos D, Martins-Filho AO, Correa-Oliveira R, Bethony JM, Vale AM, Quetz JS, Bueno LL, Silva JCF, Nascimento E, Mayrink W, Fujiwara RT 2008. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci* 85: 106-112, 2008.
- Glenny AT, Sudmersen HJ 1921. Notes on the production of immunity to diphtheria toxin. *J Hyg* 20(2): 176–220.
- Goldman AS, Goto MP 1991. Biochemical basis of the diabetic embryopathy. *Isr J Med Sci* 27(8-9):469-77.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. American cutaneous leishmaniasis *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1):71-80
- Good MF 2005. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol* 21(1): 29-34.
- Gradoni L 2001. Recent Findings on the treatment of Leishmaniasis *Ann Ist Super Sanita*.37(2):255-63.
- Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186: 1137-1147.
- Hagay ZJ, Weiss Y, Zusman I, Peled-Kamar M, Reece EA, Eriksson UJ, Groner Y 1995. Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am J Obstet Gynecol* 173:1036–1041.
- Hansen WF, Peacock AE, Vankowitz J 2002. Safe prescribing practices in pregnancy and lactation. *J Midwifery Womens Health* 47: 409-421.
- Harder S, Bente M, Isermann K, Bruchhaus I 2006. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryotic Cell* 5:861-870.
- Hasselquist D, Nilsson, J 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Phil Trans R Soc B* 364 (1513): 51-60.
- Hod M, Star S, Passonneau J, Unterman TG, Freinkel N 1990. Glucose-induced dysmorphogenesis in the cultured rat conceptus: prevention by supplementation with myo-inositol. *Isr J Med Sci* 26(10):541-544
- Hopkins M, Lees B, Richardson D, Woroniecki S, Wheeler A 2001. Standardisation of glutaraldehyde-modified tyrosine-adsorbed tree pollen vaccines containing the Th1-inducing adjuvant, monophosphoryl lipid A (MPL). *ALLERGOL IMMUNOPATHOL* 29: 245–254.
- Hviid TV 2006. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 12(3):209.

- Islam SK, Akhan MN, Huque S, Begum A, Yunus AB 2006. Immune components (IgA, IgM, IgG, immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. *Pediatr Int* 48(6):543-548.
- Janeway CA, Medzhitov R 2002. Innate Immune Recognition *Annu. Rev. Immunol* 20:197–216
- Jeffcott LB 1972. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biol Rev* 47 (4): 439-464.
- Jones D, Elloso MM, Showe L, Williams D, Trinchieri G, Scott P 1998. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun* 66, 3818–3824
- Kaufmann SHE 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today* 11: 129-136.
- Kedzierski L 2010 Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis* 2(2): 177–185
- Khera KS 1985. Maternal toxicity a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformation of rabbit-rodent species. *Teratology*, 31: 129-153.
- Knox DP, Redmond DL, Skuce PJ, Newlands GF 2001. The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Veter Parasitol*, 101: 311-335, 2001.
- Koren G, Pastuszak A, Ito S 1998. Drugs in pregnancy. *N Engl J Med* 338 (16):1128-1137.
- Krishnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M, Mosmann TR 1996. T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* 156:653–662
- Lainson R 1983. The American leishmaniases: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 569-596, 1993.
- Lainson R, Shaw JJ 1988. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp* 63: 134-145
- Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebratu YB, Gitire JI, Koech DK, Roberts CR 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus dubosqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 43:31-43
- Lemesre JL, Holzmüller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G 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* 25(21):4223-4234
- Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM 1998. Identification and characterisation of a functional peroxidase from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasit* 96:125–137.
- Lewis DB, Wilson CB 2006. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; p. 87- 210.

- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG 1993. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface *J Immunol*. 151(9):4562-4573.
- Low GC, Cooke WE 1926. A congenital case of kala-azar. *Lancet* 208(5389):1209-1211.
- Machado-Coelho GL, Assunção R, Mayrink W, Caiaffa WT 1999. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *Int J Epidemiol* 28: 982-989, 1999.
- Manson JM, Kang YJ 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology, pp. 989-1034. In: A. W. Hayes (ed.), *Principles and methods of toxicology*. 3.ed., Raven Press, New York.
- Maródi L 2006. Innate cellular immune responses in newborns. *Clinical immunol* 118: 137-44.
- Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M 1996. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 106 (1): 127-136.
- Mattner F, Alber G, Magram J, Kopf M 1997(a). The role of IL-12 and IL-4 in *Leishmania major* infection. *Chem Immunol* 68: 86-109.
- Mattner F, Di PK, Alber G 1997(b). Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun* 65: 4378-4383.
- Manuel, J 2002. Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2: 201-226.
- McCoy GC, Reneau JK, Hunter AG, Williams JB 1970. Effects of diet and time on blood serum proteins in the newborn calf. *J of Dairy Sci* 53,(3): 358-362.
- McGonigle S, Dalton JP, James ER 1998. Peroxidoxins: A New Antioxidant Family. *Parasitol Today* 14(4): 139-145.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskan L, Fleisher B 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (kala-azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 104:e65.
- Melby PC 2002. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* 3(8):557-570
- Menezes-Souza D, Mendes TAO, Nagem RAP, Santos TTO, Silva ALT, Santoro MM, Carvalho SFG, Coeho EAF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, 2014(a) Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9(6):e99216.
- Menezes-Souza, D. Mendes TAO, Gomes MS, Reis-Cunha, JL, Nagem RAP, Carneiro CM, Coelho EAF, Galvão LMC, Fujiwara RT, Bartholomeu DC 2014(b). Epitope mapping of the HSP-83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 21(7):949-959.
- Menezes-Souza, D, Mendes TAO, Leão ACA, Gomes MS, Fujiwara RT, Bartholomeu DC 2015 (a). Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(3):1323-1336.

- Menezes-Souza, D. Mendes TAO, Gomes MS, Bartholomeu DC, Fujiwara RT 2015(b) Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1):e3426. 8.
- Michelon T, Silveira JG, Graudenz M, Neumann J 2006. Imunologia da Gestação *Revista da AMRIGS*, 50 (2): 145-151.
- Michimata T, Ogasawara MS, Tsuda H, Suzumori K, Aoki K, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S 2002. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and Th2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 47: 196–202.
- Miklovicova D, Cervenova O, Cernianska A, Jancovicova Z, Dedik L, Vasilenkova A 2008. Long-term follow-up of renal function in patients after surgery for obstructive uropathy. *Pediatr Nephrol.* 23(6): 937-45.
- Miret J Nascimento E, Sampaio W, Silva JCF, Fujiwara RT, Vale AM, Dias ES, Vieira E, Costa RT, Mayrink W, Campos-Neto A, Reed S 2008. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f +MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine (Guildford)* 26: 1585-1594.
- Moraes C, Topyla VS, Paês RAP, Cuzy AF, Teleses JJA 1995. Leishmaniose visceral durante a gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet* 17(6):667-9.
- Moraes-Souza RQ 2015. Repercussões maternas de ratas vacinadas com proteína peroxidoxina recombinante de *Leishmania braziliensis* durante a prenhez. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso, Barra do Garças-MT, 50p.
- Morceli G, França EL, Magalhães VB, Damasceno DC, Calderon IMP, Honorio-França, AC 2011. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrums. *Acta Paediatr* 100 (4): 550-556.
- Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, 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.
- Morgan D, Guimarães LH, Machado PRL, D'Oliveira Jr A, Almeida RP, Lago EL, Faria DR, Tafuri WL, Dutra WO, Carvalho EM 2007. Cutaneous Leishmaniasis during Pregnancy: Exuberant Lesions and Potential Fetal Complications *Clin Infect Dis* 45 (4):478-482.
- Mossalayi MD, Arock Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today* 15: 342-345.
- Mosser DM, Zhang X 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226:205-18
- Murback NDN, Nascimento RAF, Dorval MEMC, Hans Filho G, Nakazato KKO 2011. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Na Bras Dermatol* 86(1): 55-63.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.

- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, Coffman RL 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun* 70: 6284-6293
- Mussi-Pinhata M, Rego MAC, 2005. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. *J Pediatr* 81(1 Supl):S59-S68.
- Nagao AT, Arslanian C, Solé D, Carneiro-Sampaio MMS 1999. Placental transfer of IgG antibodies against Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide in Brazilian term and preterm newborns. *J Trop Pediatr* 45:171-73.
- Nagao, AT, Friedlander-Del Nero D, Arslanian C, Carneiro-Sampaio, MMS 2001. Elevated levels and different repertoire profile of colostral anti- LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity. *J Immunol* 53:602-609.
- Nagata, T Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y 2004. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology* 23(2):93-106.
- Neogy AB, Vouldoukis I, Da Costa JM, Monjour L 1994. Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. Veterinary Group of Lupino. *Vet. Parasitol* 54:367-373.
- Neubert D, Kavlock RJ, Merker HJ, Klein J (Eds.) 1992. Risk assessment of prenatally-induced adverse health effects. Berlin: Springer – Verlag, 565 p.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV 2008. Fc gamma receptors as regulators of immune responses *Nat Rev Immunol* 8(1):34-47.
- Noli C, Auxilia ST 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 16: 213-232.
- Ortiz MV, Croxatto HB 1979. Ovum Transport and Fertility following Postovulatory Treatment with Estradiol in Rats M-E. *Biology of Reproduction* 21: 1163-1167.
- Palatnik-de-Sousa CB 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*.26(14):1709-1724.
- Passa S, Toz SO, Voyvoda H, Ozbel Y 2005. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 128: 243-249.
- Penido MLO, Nelson DL, Coelho PMZ 1999. Efficacy of a New Schistosomicidal Agent 2-[(methylpropyl)amino]-1-octanethiosulfuric acid against an Oxamniquine Resistant *Schistosoma mansoni* Isolate. *Mem Inst Osw Cruz* 94(6): 811-813.
- Pessoa SB, Martins AV 1988. Parasitologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 872.
- Peters CA, Chevalier RL 2012. Congenital urinary obstruction: pathophysiology and clinical evaluation. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. 10th edition. Philadelphia: Elsevier (Saunders), 2012. p. 3028-3047.
- Peters W 1993. Heterogeneity of cutaneous leishmaniasis with emphasis on the Old World. *Schweiz Med Wochenschr* 123: 1237-1249.
- Piccinni MP, Beloni L, Livi C. 1998. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Med* 4: 1020–1024.

- Pimentel MA 2010. Vacinação durante a gravidez. *Acta Medica Portuguesa* 23:837-840.
- Pinter E, Reece EA, Leranath C 1986. Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycemia. Ultrastructural analysis of yolk sac differentiation associated with embryopathy in rat conceptuses under hyperglycemic condition. *Teratology*. 33:73–84.
- Porter P 1976. Immunoglobulin mechanisms in health and nutrition from birth to weaning. *Proc Nutr Soc* 35(3): 273-282.
- Puig-Barbera J 2004. Vacunas y embarazo (I): vacunas indicadas en las mujeres embarazadas. *Aten Primaria* 33(1):38-43.
- Quinello C, Quintilio W, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P 2010. Passive Acquisition of Protective Antibodies Reactive with *Bordetella pertussis* in Newborns via Placental Transfer and Breast-feeding. *Scand J Immunol* 72(1):66-73.
- Ramon G 1924. Sur la toxine et sur l' anatoxine diphtériques. *Ann Inst Pasteur* 38:1–10.
- Ravindran R, Bhowmick S, Das A, Ali N 2010. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis *BMC Microbiology* 10(181): 3-10.
- Reed SG, Campos-Neto A 2003.. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Cur Op Immunol* 15: 456-460.
- Rey L 2001. Bases da Parasitologia Médica, 2ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349.
- Rittig MG, Bogdan C 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16: 292-297, 2000.
- Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital, W 2012. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lutzomia longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *Plos One* 7(11):1-12.
- Rogers ME, Bates PA 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 3(6): e91 0818-0825.
- Rogers DJ 1988. The dynamics of vector-transmitted diseases in human communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 321: 513-539.
- Ruckebusch Y, Aneuf LP, Dunlop R (Eds) 1991. Hormones of the testes. Physiology of small and large animals. Philadelphia: B.C. Decker, p.556-562.
- Ryan L, Lainson R, Shaw JJ 1987. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Para State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra dos Carajas. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 353-359.
- Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H 1999. Increased T-helper 1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 41:297-306.
- Saldarriaga OA, Travi BL, Park W, Perez LE, Melby PC 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24: 1928-1940.
- Salewski E 1964. Farbemethode zum markroskopischen nachweis von implantatconsstellen an uterus der ratter naunyn schmuderbergs.. *Exper Pathol Pharmak* 247:121-135.

- Salimonu LS, Ladipo OA, Adeniran SO, Osukoya BO 1978. Serum immunoglobulin levels in normal, premature and postmature newborns and their mothers. *Int J Gynecol Obstet* 16:119-23
- Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL 2009. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Rev Soc Bras Med Trop* 42 (6): 686-690.
- Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Silva AC 2010. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 48(5):1866-1874.
- Santos WR, Lima, VMF, Souza, EP 2002. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21: 30-43.
- Sarafana S, Coelho R, Neves A, Trindade JC 2007. Aspectos da imunologia da gravidez. *Acta Med Port* 20: 355-358.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS 2005. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet Parasit* 130: 199-205.
- Schettters T 2005. Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol* 21 (4):179-184.
- Schlein Y 1993. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*, 9: 255-257.
- Schüler-Faccini L, Leite JCL, Sanseverino MTV, Peres RM 2002. Evaluation of potential teratogens in brazilians population. *Ciênc Saúde Colet* 7(1):65-71.
- Schüller-Faccini L, Schwartzman L, Cecchin C 2001. Teratogênese humana e o SIAT. In: Sanseverino MT, Spritzer D, Schüller-Faccini L, organizadores. Manual de teratogênese. Porto Alegre: Editora da Universidade; 2001. p. 11-17.
- Segal AW 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197- 223.
- Serbina, NV, Jia T, Hoh M, Pamer EG 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26:421-452.
- Seth G, Hossler P, Yee JC, Hu WS 2006. Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 101: 119-164.
- Shaw J 2007. The leishmaniases - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(5): 541-547.
- Shepard TH 1995. Agents that cause birth defects. *Yonsei Med J* 36: 393-396.
- Silveira BP, Araújo Sobrinho J, Leite LF, Sales MNA, Gouveia MAS, Mathias RL 2003. Parto prematuro após uso de antimonial pentavalente: relato de um caso. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(4):523-525.
- Simister NE, Story CM 1997. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol* 37:1-23
- Simpson MMW, Smeaton TC 1972. The transfer of antibodies by neonates and adults. *Adv in Vet Sci and Comp Med* 16: 355-381.
- Singh M, Srivastava I 2003. Advances in Vaccine Adjuvants For Infectious Diseases *Current HIV Res* 1(3): 309-320.

- Singh B, Sundar S 2012. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 30(26): 3834-3842.
- Singh RK, Pandey HP, Sundar S 2006. Visceral leishmaniasis (Kala-azar): Challenges ahead (Review). *Indian J Med Res* 123:331-344
- Singh M, O'hagan DT 2002. Recent advances in vaccine adjuvants, *Pharmac Res* 19(6): 715-728.
- Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Craner RT 2002. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*. 20:3292-3303.
- Smeaton TC, Simpson-Morgan MW 1985. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the foetal and neonatal lamb. *Australian J Exp Biol and Med Sci* 63: 41-51.
- Solecki R, Bergmann B, Bürgin H, Buschmann J, Clark R, Druga A, Van Duijnhoven EAJ, Duverger M, Edwardsi J, Freudenberger H, Guittin P, Hakaite P, Heinrich-Hirsch B, Hellwig J, Hofmann T, Hübel U, Khalil S, Klaus AM, Kudicke S, Lingk W, Meredith T, Moxon M, Müllers S, Pault M, Paumgarten F, Röhrdanz E, Pfeil R, Rauch-Ernst M, Seed J, Spezia F, Vickers K, Woelffelt B, Chahoud I 2003. Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification Report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18–20 April 2002 - *Reprod Toxicol* 17:625–637
- Solecki R, Barbellion S, Bergmann B, Bürgin H, Buschmann J, Clark R, Comotto L, Fuchs A, Faqi A, Gerspach R, Grote K, Hakansson H, Hofmann T, Hübel U, Inazaki TH, Khalil S, Knudsen TB, Lingk W, Kudicke S, Makris S, Müller S, Paumgarten F, Roma EM, Schneider S, Shiota K, Tamborini E, Tegelenbosch M, Tiramani M, Ulbrich B, Van Duijnhoven EAJ, Wise D, Chahoud I 2013 - Harmonization of description and classification of fetal observations: Achievements and still standing problems. Report of the 7th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 4–6 May 2011 *Reprod Toxicol* 35: 48-55.
- Sorensen AL, Hey AS, Kharazmi A 1994. Leishmania major surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*.102(4): 265-71.
- Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto-Junior S, Ferreira MS 2005. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(2): 137-141.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28:187-248, 2002.
- Staples RE, Schnell VL 1964. Refinements in rapid clearing technique in the KOH alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 39: 61–63.
- Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci* 97: 8427-8432.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118(4): 1301–1310.

- Succi RC, Farhat CK 2006. Vaccination in special situations. *J Pediatr* 82(3):91-100.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:951-958.
- Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:662-680.
- Takeuchi O, Akira S 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Tannús MM, Rodrigues FH, Mastrantonio EC, Rocha FA, Pereira CG, Silva ALN, Souza MA 2007. Reatividade sorológica de cães frente a antígenos de três espécies de *Leishmania*. *Horizonte Científico* 1(1):1-28.
- Tavares MV, Ramos VN, Tavares M, Moura P 2011 Vacinas e gravidez, *Acta Med Port*, 24(4):1063-1068.
- Tavares NM, Santos DM, Oliveira CI, Brodskyn CI 2009. Estratégias De Vacinação Contra Leishmaniose Visceral E Cutânea: Lições Dos Modelos Experimentais. *Gazeta Médica da Bahia* 79 (Supl.3):110-121
- Tesh R 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 52:287-92
- Todoli F, Mariano PF, Inmaculada G, Silvia GS, Jose ME, Alheli RC, Jordi A 2009. Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP11, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Veterinary Parasitology* 164:154-161
- Trujillo C, Ramírez R, Vélez ID, Berberich C. 1999. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunology Letters* 70(3):203-209.
- Van Tienhoven EA, Ten Brink CT, Van Bergen J, Koning F, Van Eden W, Broeren CP 2001. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine* 19(11-12):1515-1519
- Vercruysse J, Knox DP, Schettters TPM, Willadsen P 2004. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol* 20(10):488-492.
- Viana GMC, Nascimento MDSB, Viana MGC, Burattini MM 2001. Transmissão congênita do Calazar. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(1):247.
- Vieira ML, Jacobina RR, Soares NM 2007. Leishmaniose visceral em adolescente gestante. *Rev Ciênc Méd Biol* 6(3):357-361.
- Volpato GT, Francia-Farge LAD, Damasceno D, Oliveira RV, Hiruma-Lima CA, Kempinas W 2015. Effect of essential oil from *Citrus aurantium* in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats. *An Acad Bras Cienc* 87 (1): 407-415.
- Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC 2011. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 138: 691-696.

- Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MVC, Padovani CR, Calderon IMP 2008. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 116: 131-137.
- Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F 2006. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of merboflaxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol* 135, 137-146.
- Wannmacher L 2004. Fármacos em gestação e lactação. In: Fuchs FD, Wannmacher L (organizadores) Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004. p. 936-41.
- Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG 1998. Human and Murine Immune Responses to a Novel *Leishmania major* Recombinant Protein Encoded by Members of a Multicopy Gene Family. *Infect Immun* 66(7):3279-3289.
- Webster WS 1998. Teratogen update: congenital rubella. *Teratology* 58:13-23.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 14(7):353-356.
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375(6530): 408-11.
- Weigle K, Saravia NG 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 14: 433-450.
- Who - World Health Organization. 2004. Scientific work group report on Leishmaniasis. Disponível em : <http://www.who.int/tdr/TDR/SWG/04>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- Who. World Health Organization. 2010. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/). Acesso em: 03 fev 2015.
- Who - World Health Organization, 2012. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em: 03 fev 2015
- Wilson JG, Warkany J 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. *Teratology: Principles and Techniques*. University of Chicago Press, Chicago. 47-74.
- Yadav TP, Gupta H, Sattaya U, Kumar R, Mittal V 1989. Congenital kala-azar. *Ann Trop Med Parasitol* 83:535-7.
- Yoshikazu HO, Annasaheb K, Lei L, Nikolai P 2014. A single immunization with inactivated H1N1 influenza vaccine Formulated with delta inulin adjuvant (advaxtm) overcomes Pregnancy-associated immune suppression and enhances passive Neonatal protection. *Vaccine* 32:4651-4659.
- Zhizhen Q, Haihong Z, Qingwen Z, Yujing B, Lingling R, Xuecan Z, Hanqing Y, Xiaoyan Y, Qiong W, Cunxiang L, Jiyuan Z, Youquan X, Yonghai Y, Huiying Y, Zongmin D, Yafang T, Yanping H, Yajun S, Lei Z, Pingping Z, Yujun C, Yanfeng Y, Dongsheng Z, Ruifu Y, Xiaoyi W 2012. Acquisition of Maternal Antibodies both from the Placenta and by Lactation Protects Mouse Offspring from *Yersinia pestis*. *Clin Vaccine Immunol* 19(11):1746-1750.

**Anexo: Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMT)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.007931/14-0, sobre "Avaliação da segurança reprodutiva e da transferência passiva de imunidade em ratos Wistar após processo de imunização contra as leishmanioses durante a prenhez", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. GUSTAVO TADEU VOLPATO/ANA PAULA BARCELOS REINAQUE & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 22/05/2014.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol Nº 23108.007931/14-0, entitled "Evaluation of the reproductive outcome and passive transfer of immunity in Wistar rats after immunization process against leishmaniasis during pregnancy", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **May 22, 2014**.

Cuiabá-MT, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso  
Presidente

Profª Drª Nair Honda Kawashita  
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT  
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367  
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829  
Fax.: (65) 3615 8254  
E-mail: cepa@ufmt.br

