ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E EFICÁCIA PROTETORA DE UMA PROTEÍNA HIPOTÉTICA DE LEISHMANIA COMO CANDIDATA À VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL

Evaluation of immunogenicity and protective effectiveness of a hypothetical protein from leishmania as candidates for the vaccine against visceral leishmaniosis

Ulisses Guimarães Fernandes Filho[1], Sofia Assis Alvarenga[1], Marta Bhering Pereira de Souza[1] Sandra Regina Quintino dos Santos[2] , Lourena Emanuele Costa[3], Eduardo Antônio Ferraz Coelho[4].

RESUMO

Introdução: Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de evolução aguda ou crônica, causadas por parasitos protozoários do gênero Leishmania. Atualmente, existe apenas uma vacina canina comercialmente disponível (Leish-tec®), no entanto, é uma vacina que não apresenta um amplo espectro de proteção contra todas as espécies de leishmaniose. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina contra uma ou mais espécies do gênero Leishmania poderia representar um grande avanço quanto à profilaxia e ao controle epidemiológico da doença. **Objetivo:** Avaliação da imunogenicidade da proteína hipotética (XP_001468309.1) em camundongos BALB/c e eficácia protetora contra a infecção com *L. infantum*. **Método:** Estudo experimental intervencionistacom camundongos em que foi realizada a clonagem, expressão e purificação da proteína. A proteína recombinante foi inoculada e, ao final dos experimentos, foi analisado os níveis de citocinas, de IgG1 e IgG2a, por método ELISA, a carga parasitária por diluição limitante PCR quantitativo e a produção de óxido nítrico por Método Griess. **Resultados:** Os resultados mostraram que as células coletadas estimuladas por LiHyR produziram níveis mais altos de IFN-γ, IL-12 eGM-CS, demonstrando um predomínio da resposta Th1. Quanto a análise da resposta humoral, notou-se uma maior resposta IgG2a. A dosagem de óxido nítrico apresentou níveis consideravelmente altos na imunização com a proteína LiHyR e com proteína combinada com SLA. Em todos os órgãos avaliados foi observado uma redução significativa na carga parasitária. **Conclusão:** Os dados obtidos demonstram uma prova da eficácia de uma nova proteína hipotética de Leishmania para induzir uma resposta de proteção contra a Leishmaniose Visceral, quando administrada uma vacina na forma recombinante.

Palavras-chave: Imunogenicidade; Leishmaniose Visceral; Proteínas recombinantes; Vacinas; Leishmania infantum.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis are infectious and parasitic diseases of acute or chronic evolution, caused by protozoan parasites of the genus Leishmania. Currently, there is only one commercially available canine vaccine (Leish-tec®), however, it is a vaccine that does not have a broad spectrum of protection against all species of leishmaniasis. In this context, the development of a vaccine against one or more species of the genus Leishmania could represent a major advance in terms of prophylaxis and epidemiological control of the disease. **Objective**: Evaluation of the hypothetical protein immunogenicity (XP_001468309.1) in BALB / c mice and protection against infection by L. infantum. **Method**: Experimental intervention study with mice in which protein cloning, expression and purification were performed. The recombinant protein was inoculated and, at the end of the experiments, the levels of cytokines, IgG1 and IgG2a were analyzed by the ELISA method, the parasitic load by quantitative PCR limiting dilution and the production of nitric oxide by the Griess method. **Results**: The results showed that the cells collected stimulated by LiHyR produced higher levels of IFN-γ, IL-12 and GM-CS, demonstrating a predominance of the Th1 response. As for the analysis of the humoral response, a greater IgG2a response was noted. The dosage of nitric oxide showed considerably high levels of immunization with the LiHyR protein and with the protein combined with SLA. In all the evaluated organs, a significant reduction in the parasitic load was observed. **Conclusion**: The data obtained demonstrates a proof of the effectiveness of a hypothetical new Leishmania protein to induce a protective response against Visceral Leishmaniasis, when administered as a vaccine in recombinant form.

Keywords: Immunogenicity; Visceral Leishmaniasis; Recombinant proteins; Vaccines; Leishmania infantum.

[1] Acadêmicos de Medicina da Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG-Brasil.
[2] Docente da Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG- Brasil.
[3] Graduada em Enfermagem pela Universidade Federal de Minas Gerais e em Medicina pela Faculdade da Saúde e Ecologia Humana. Mestrado, Doutorado e Pós-doutorado em Ciências de Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG – Belo Horizonte, MG- Brasil.
[4] Professor associado da Universidede Federal de Minas Gerais - UFMG – Belo Horizonte, MG- Brasil.
Autor para correspondência: Ulisses Guimarães Fernandes Filho – Rua Sergipe, Nº 43. Bairro: Centro – CEP: 30130-170 - Belo Horizonte, MG - Brasil. E-mail: ulissesgffilho@gmail.com

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de evolução aguda ou crônica, causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo endêmicas em 98 países no mundo. Devido à magnitude e à complexidade clínica, biológica e epidemiológica, elas são consideradas um importante problema de saúde pública. Cerca de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) registrados nas Américas ocorrem no território brasileiro, dados que corroboram sua relevância. [1,2]

No Brasil, existem cerca de sete espécies do parasito capazes de causar a doença no homem, sendo que a espécie *L. infantum* (*L. chagasi*) é a responsável pelos casos de LV[2]. A leishmaniose pode apresentar diferentes quadros clínicos que dependem, principalmente, da espécie infectante do parasito e do estado imunológico do hospedeiro infectado[3,4,5]

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde (MS) prevê ações para a redução da transmissão e da morbimortalidade. Tem-se, portanto, como medidas profiláticas e de controle contra as leishmanioses a interrupção do ciclo biológico do parasito.. Deve ser feito o controle vetorial, indicado pelo PVCLV que é composto de três medidas gerais: o diagnóstico clínico-laboratorial da doença seguido do tratamento dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos, eliminação de reservatórios e atividades de educação em saúde, que devem estar inseridas em todos os serviços que desenvolvem as ações de controle da LV. Ações para a redução da letalidade envolvem o aperfeiçoamento dos procedimentos para o diagnóstico precoce e a pronta disponibilidade de medicamentos para o tratamento.[6,7]

Atualmente, existe apenas uma vacina canina comercialmente disponível (Leish-tec®), com uma melhor eficácia, aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo MS, no entanto, é uma vacina espécie-específica, ou seja, que não apresenta um amplo espectro de proteção contra todas as espécies de leishmaniose. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina contra uma ou mais espécies do gênero *Leishmania* poderia representar um grande avanço no que diz respeito à profilaxia e ao controle epidemiológico da doença no Brasil e nos demais países onde a doença é endêmica.[8]

A elaboração de uma vacina a partir de uma proteína recombinante tem a capacidade de produzir antígenos estáveis e de aumentar a resposta imune de memória, sendo vantajoso no combate contra a leishmania. Para isso, deve-se conseguir estabelecer uma elevação de citocinas relacionadas com o estímulo Th1, em especial com aumento de IFN- γ. Vacinas de DNA tem a capacidade de envolver vias principais do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I e MHC classe II, responsáveis por induzir os subtipos de Célula T. As vacinas de DNA apresentam propriedades intrínsecas induzindo esse tipo de resposta e podem resultar em imunidade duradoura, por isso são fortes candidatas vacinais. [9]

Sendo assim, este artigo apresenta resultados de avaliação da imunogenicidade da proteína hipotética (XP_001468309.1) em camundongos BALB/c e eficácia protetora contra a infecção com *L. infantum*. Além disso, o estudo objetivou clonar, expressar e purificar a proteína recombinante. Imunizar camundongos BALB/c com a mesma e avaliar a imunogenicidade (resposta celular e humoral) por meio da avaliação da produção de citocinas e imunoglobulinas por ELISA de captura e avaliação do óxido nítrico pelo método Griess. Infectar os animais com *L. infantum* e avaliar o grau de proteção por meio da determinação da carga parasitária nos órgãos alvos dos animais, usando a técnica de diluição limitante e por análises microscópicas de lâminas de tais órgãos.

MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental intervencionista realizado com camundongos da raça BALB/c fêmeas, de 8 semanas de idade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 333/2015, CEUA/UFMG).

Amostra

O estudo foi realizado com 8 camundongos da raça BALB/c fêmeas, de 8 semanas de idade, por grupo, dividido em grupo controle imunizado e grupo imunizado com infecção desafio. O número de animais por grupo deveria ser de 7 camundongos, mas considerando a perda possível de 10% do valor total de animais durante o período do experimento, o número final de animais por grupo foi acertado para 8 animais. Os animais foram adquiridos e mantidos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

Delineamento do Estudo

O projeto foi realizado a partir de uma parceria entre a Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais (FCMMG) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O desenho experimental é apresentado na Figura 1.

A figura 1 representa como foi feito o experimento, que consistiu na administração de uma dose da vacina (proteína recombinante), aplicada juntamente com um adjuvante, no volume 25 µl no coxim plantar esquerdo de cada camundongo. O adjuvante é utilizado para induzir uma maior resposta de Th1. Após 15 dias foi administrada uma 2ª dose e após mais 15 dias uma 3ª dose. Decorridos 30 dias, foi feito o primeiro sacrifício de metade dos animais, enquanto a outra metade sofreu a infecção desafio. Decorridos 30 dias da infecção, totalizando 60 dias desde a 3ª dose, é feita a eutanásia da segunda metade dos camundongos.Por fim, todos os dados das análises propostas na metodologia de forma quantitativa foram obtidos.

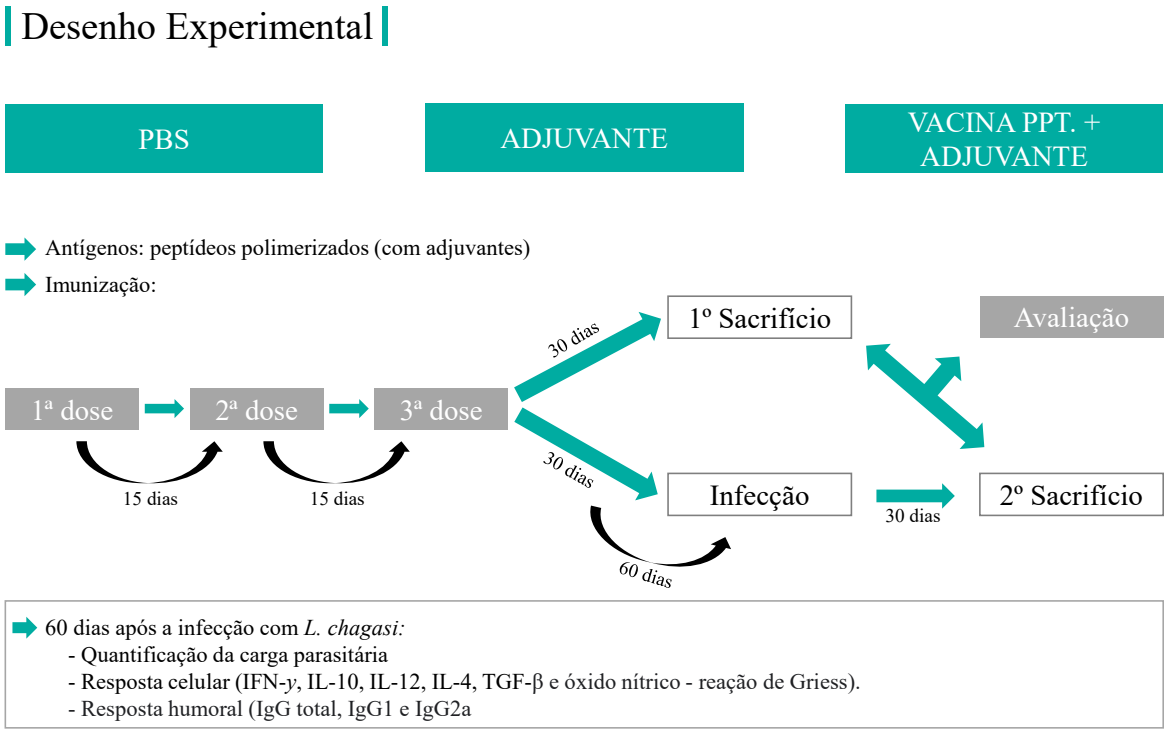


Figura 1. Desenho experimental do esquema de imunização, infecção desafio e parâmetros a serem analisados.

Procedimentos

A cepa *L. Infantum* utilizada (MHOM/BR/1970/BH46) foi cultivada em meio de cultura de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma), 200 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina, em pH 7.4 – meio de cultura completo. Os parasitas permaneceram em cultivo a 24ºC, sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção dos parasitas.

A proteína de trabalho foi depositada no GenBank pelo código (XP_001468309.1) e os seguintes procedimentos experimentais foram realizados: a amostra MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum* foi utilizada para a extração do DNA genômico, segundo protocolo descrito por Piarroux *et al* [10] A sequência codificadora da proteína foi avaliada e os iniciadores específicos foram desenhados e construídos. A proteína foi clonada em vetor de expressão pET16b, de acordo com protocolo descrito em Martins *et al* [11] e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel.

O protocolo de imunização foi feito com a administração isolada ou em associação da proteína recombinante em grupos de camundongos BALB/c (8 semanas de idade; n=8 por grupo) por via subcutânea e no coxim plantar esquerdo. Três doses dos imunógenos foram administradas (25 µl), em intervalos de 15 dias, em um volume final de 75 µl por animal no coxim plantar esquerdo. Para a infecção desafio, que foi realizada 30 dias após a última dose das imunizações, foram utilizadas 1 x 107 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum.* Os parasitas foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito dos animais em um volume final de20 uL e diluídos uma vez em PBS.

Ao final dos experimentos (cerca de 10 semanas após a infecção), a quantificação de parasitas foi realizada por meio da técnica de diluição limitante. Para tal, a carga parasitária foi determinada após o sacrifício dos animais e a remoção de fragmentos do fígado, baço, medula e cérebro dos animais. Os materiais foram pesados, homogeneizados em meio de Schneider's completo (proporção de 100 mg para cada 1 mL de meio de Schneider's incompleto) e macerados em triturador de vidro estéril. A suspensão obtida foi plaqueada, em duplicata, e diluições sucessivas foram realizadas da ordem de grandeza logarítmica de 100 à 10-10, em placas de cultura de 96 poços (Nunclon, Nunc, Denmark). As placas foram incubadas por 7 dias a 24ºC e depois foram levadas a um microscópio invertido para análise. O resultado final foi determinado da maior diluição logarítmica na qual parasitas móveis poderiam ainda ser visualizados. Além disso, foi realizada também a contagem microscópica dos parasitas nos tecidos maciços citados anteriormente.

Os baços dos camundongos imunizados e/ou desafiados que foram sacrificados passaram por um processo de isolamento, cultura e estimulação dos esplenócitos. Para tal, um dia antes da infecção desafio ou cerca de 10 semanas após o desafio, 4 animais por grupo foram sacrificados e o baço e fígado foram coletados para o cultivo das células e a posterior análise de citocinas produzidas nos sobrenadantes das culturas. Os órgãos passaram por um processo de maceração em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) completo, constituído pelo meio DMEM acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado, 4,5 g/L de glicose, 20 ug/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50 ug/mL de estreptomicina, pH 7,4, em placas de cultivo celular de 24 poços (Nunclon, Nunc, Denmark). Após a maceração, foi feita a lavagem das células em meio DMEM incompleto e, em seguida, a lise de hemácias com tampão de lise (Tris HCl 17 mM pH 7,4 e cloreto de amônio 144 mM), por 3 min. As células foram recuperadas por centrifugação (1500 g por 10 min a 4ºC) e ressuspendidas em 1 mL de DMEM completo. Em seguida, foi realizada a quantificação das células em câmara de Newbauer e ajustadas para uma concentração final de $5x10^6$ células/ml, sendo então diluídas em meio DMEM completo e plaqueadas em placas de 24 poços. As concentrações da proteína e do extrato proteico de Leishmania, como antígenos estimuladores, foram as menores possíveis capazes de induzir à máxima produção de citocinas, definidas através da realização

de uma curva padrão dose-resposta. Concanavalina A (ConA) foi utilizada para o controle da viabilidade celular. Após o acréscimo dos antígenos, as placas passaram por um processo de incubação em uma estufa a 37ºC, com ambiente de 5% de CO2, por 48 horas. Os sobrenadantes de cultura celular foram então coletados e utilizados na dosagem de citocinas e o perfil da resposta celular foi avaliado pela produção de IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF. As dosagens foram realizadas pela técnica da ELISA de captura, utilizando-se os kits Intertest Mouse (Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante. Foi também realizada a dosagem de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura celular, no momento da coleta dos sobrenadantes, utilizando- se, para tal, o método de Gries.

A avaliação da produção de anticorpos foi feita a partir do perfil da resposta humoral nos animais imunizados e/ou desafiados, considerando a produção dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos à proteína e aos parasitas. Para tal, após o sacrifício, cerca de 1 mL de sangue total dos animais foi retirado pelo plexo braquial. As amostras foram então incubadas por 30 min a 37ºC e, posteriormente, centrifugadas (1.500 g por 15 min), para a obtenção de soro. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de 96 poços, utilizando-se, como antígenos sensibilizadores, a proteína recombinante ou o extrato proteico de Leishmania. As placas foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato/ bicarbonato (0,1 M/0,05 M, respectivamente, pH 9,6) e incubadas por 16 horas a 4ºC. Em seguida, foram efetuadas 3 lavagens e a solução bloqueadora (PBS 0,15 M pH 7,4 e caseína a 2%) foi acrescentada, por 2 horas a 37ºC. Novamente, as placas passaram por 3 lavagens e as amostras de soro foram acrescentadas, em duplicata, diluídas em tampão de incubação (PBS 0,15 M pH 7,4; caseína a 0,2% e Tween 20 a 0,05%), sendo mantidas em repouso por 1 hora a 37ºC. Para a determinação das absorbâncias de IgG total, IgG1 e IgG2a, as placas foram lavadas 5 vezes e os respectivos conjugados anti-IgG total, anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Sigma) de camundongo associados à enzima peroxidase (Sigma) foram acrescentados, na diluição pré-determinada, diluídos em tampão de incubação e mantidos por 2 horas a 37ºC. Após 5 lavagens, a solução reveladora foi acrescentada. Tal solução é composta pelo orto-fenilenodiamino (OPD) a 0,002% e H_2O_2 30 vol. e 10 mL de tampão citrato, pH 5,0. As placas foram incubadas por 30 min, no escuro, e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de H_2SO_4 a uma concentração 2 N. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados.

Análise Estatística

Para a definição do número de animais a serem utilizados por grupo, utilizamos o programa GraphPad –StateMate. O tamanho amostral foi baseado nas seguintes relações matemáticas:

- Definição de varíaveis – Carga parasitária.
- Escolha do tipo de teste estatístico – Teste t não-pareado.
- O desvio padrão (usualmente obtido de um piloto ou por revisão de literatura) - SD= 1,9 e variância = 3,61.
- Cálculo do erro tipo I (α) e erro tipo II (β). α = 0,05 e o erro tipo β = 0,05.
- Poder do teste (capacidade de obter um resultado de diferença estatística quando ele realmente existe). O poder usado é entre 95%.
- Alocação - Grupo não-vacinado 1: grupo vacinado1

As análises dos dados de citocinas foram realizadas através do teste t não-pareado, havendo a comparação dos grupos controle com os grupos vacinados. O teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, foram utilizados para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Análises estatísticas utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos foram realizadas. O software utilizado para a análise dos dados foi o GraphPad Prism 5.0. As diferenças serão consideradas significativas quando o valor de *P* for menor que 0.05.

RESULTADOS

Análise de Citocinas

A imunogenicidade da proteína LiHyR administrada na forma recombinante foi avaliada em camundongos BALB/c antes e após a infecção. Em relação ao perfil da resposta celular, foram avaliadas as produção das citocinas IFN- γ, IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF nos sobrenadantes de cultura das células estimuladas. Os resultados apresentados na **figura 2** mostraram que as células coletadas estimuladas por LiHyR produziram níveis mais altos de IFN-γ, IL-12 e GM-CSF (1175,25 pg/ml, 364,5 pg/ml e 309 pg/ml, respectivamente) em comparação ao leve aumento das citocinas IL-4 e IL-10 (34 pg/ml e 29,75 pg/ml, respectivamente), demonstrando um predomínio da resposta Th1 contra a infecção desafio pela *L. infantum* causadora da Leishmaniose Visceral.

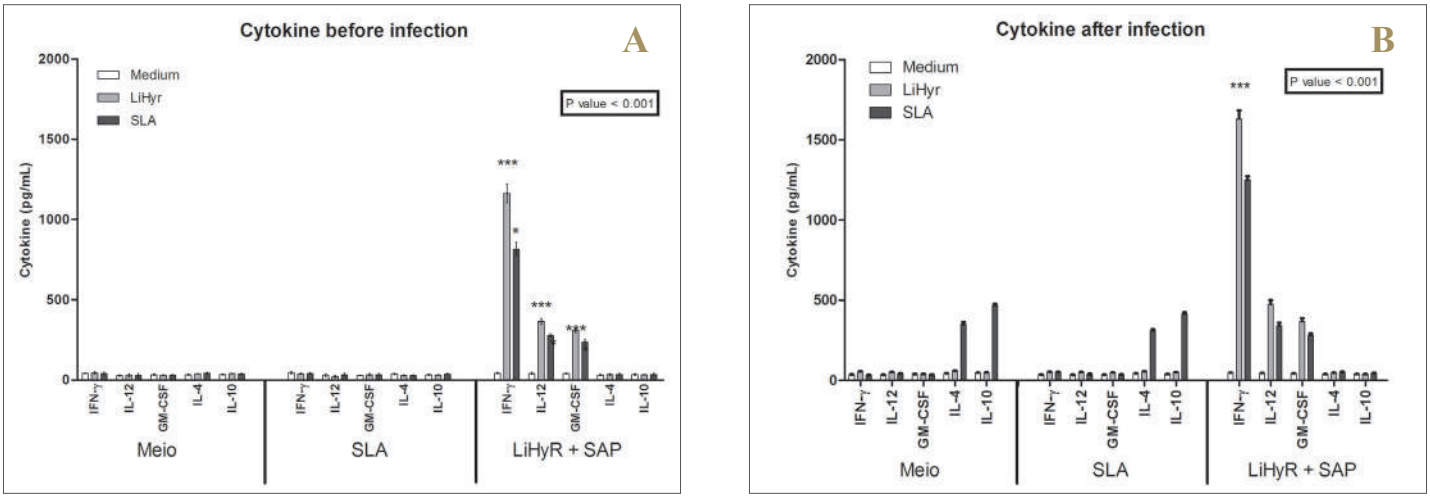


Figura 2. Resposta celular à proteína LiHyR. Trinta dias após a última imunização, foram avaliadas as amostras de soro e baço obtidas no camundongo.
* indica uma diferença estatisticamente significante a relação aos grupos salina e saponina (P <0,001).

Análise dos Níveis de IgG1 e IgG2a

Quanto a análise da resposta humoral, os camundongos que foram desafiados e imunizados com a proteína, a figura 3 apresenta maiores proporções de IgG2a/IgG1 (0,8235/0,081 ratio) se comparados com o grupo controle.

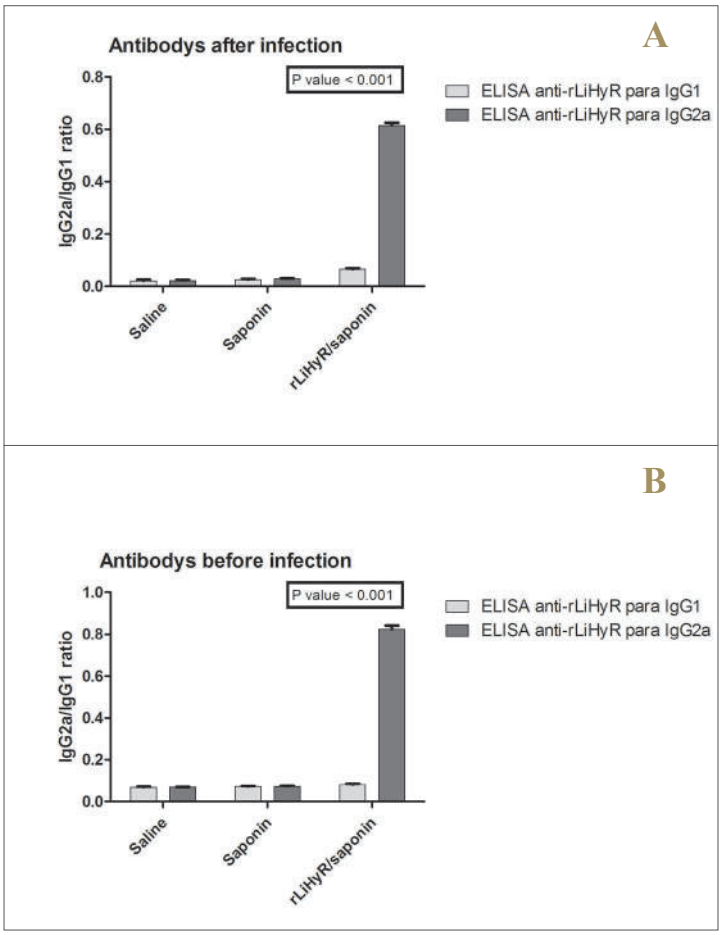


Figura 3. Resposta humoral à proteína LiHyR com produção de anticorpos nos animais infectados em comparação com os grupos controles.. Os anticorpos anti-rLiHyR IgG2a e IgG1 foram avaliados antes (A) e depois (B) da infecção desafio. *

Análise da Produção de Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi avaliada para demonstrar sua produção como marcador de ativação de macrófagos, presente em níveis consideravelmente altos, tanto na imunização apenas com a proteína LiHyR, quanto a proteína combinada com SLA, respectivamente 10,15 µM e 9,05 µM (figura 4).

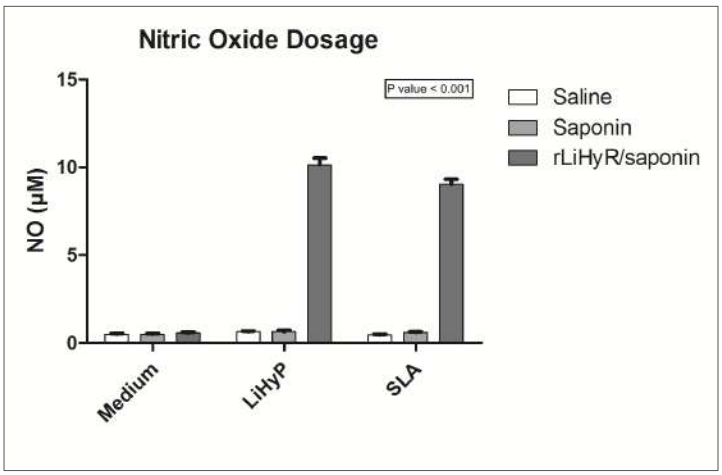
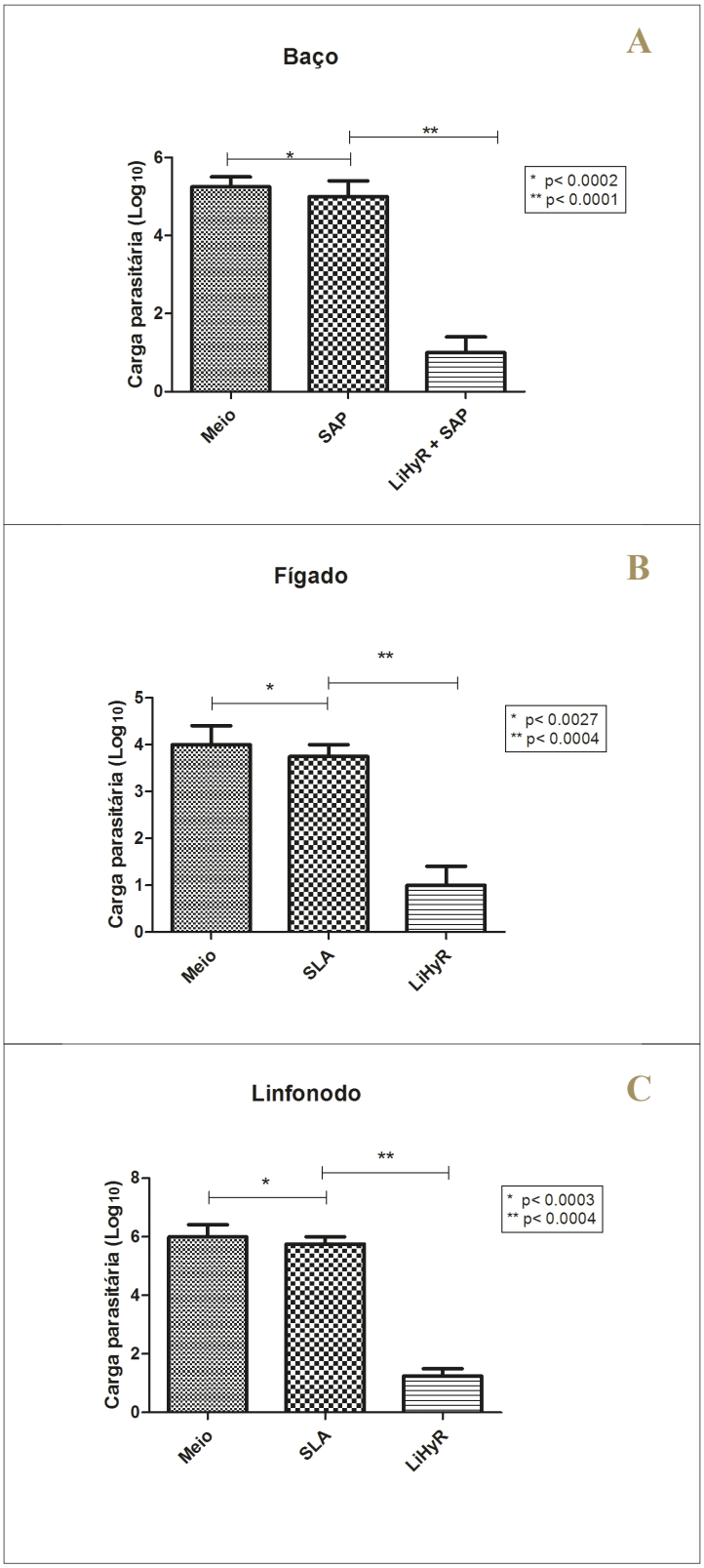


Figura 4. Gráfico de produção do NO.

Carga Parasitária

Em todos os órgãos avaliados foi observado uma redução significativa na carga parasitária quando comparados com o grupo controle. Com a proteína LiHyR a média dos valores apresentados na quantificação do órgãos baço, fígado, linfonodo e medula foram 1 log10, 1 log10, 1,25 log10 e 0,75 log10, respectivamente. Enquanto em SLA os resultados foram 5 log10 (figura 5 A), 3,75 log10 (figura 5 B), 5,75 log10 (figura 5 C) e 3,25 log10 (figura 5 D).



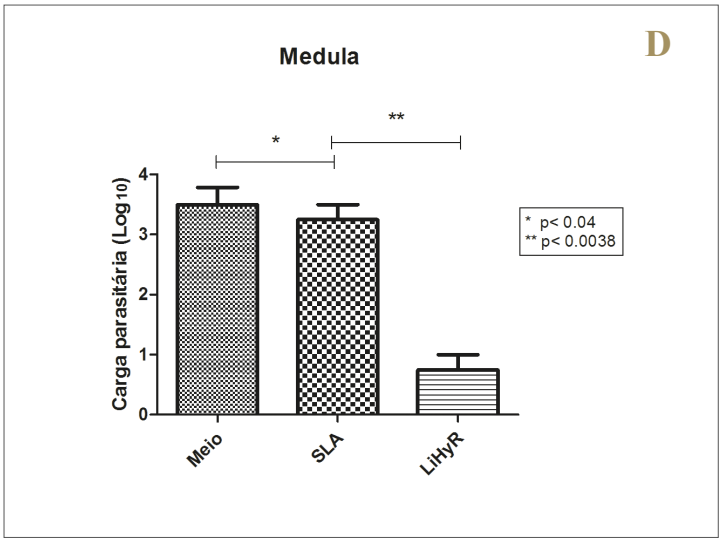


Figura 5. Carga parasitária avaliada pela técnica de diluição limitante. As barras representam a média mais o desvio padrão dos grupos. * indica uma diferença estatisticamente significante a relação ao meio, SLA e LihyR.

Análise Microscópica

Os resultados da análise microscópica realizada não atingiram significância estatística.

DISCUSSÃO

Os estudos recentes sobre a Leishmaniose têm buscado encontrar medidas de controle para a prevenção e diagnóstico da doença, destacando-se o desenvolvimento de uma vacina como um importante método para auxiliar na profilaxia.. Somado a isso, buscam antígenos que estimulam a produção de resposta imunológica contra o protozoário, a partir da utilização de parasitas mortos ou atenuados, proteínas recombinantes ou proteínas de DNA. [12, 13, 14]

A análise das citocinas é um importante marcador para avaliar a proporção das respostas Th1 e Th2, sendo esperado maiores valores de Th1, capaz de desenvolver imunidade protetora contra *L. infantum*. Há uma elevação das citocinas relacionadas com o estímulo de Th1, em especial o aumento considerável de IFN- γ, maior no grupo imunizado com infecção desafio quando comparado com o controle imunizado. Esse resultado foi observado também em outros trabalhos. [9, 15]

De acordo com Dias *et al* [9], esse é o principal marcador, uma vez que é utilizado como parâmetro para selecionar uma proteína candidata na elaboração de uma vacina contra a leishmania. Sendo assim, a escolha da proteína LiHyR como candidata vacinal de DNA é derivada da capacidade em produzir a imunidade celular esperada para doenças provocadas por parasitas intracelulares obrigatórios, como a leishmaniose. [15, 16, 17]

A avaliação da imunogenecidade da proteína LiHyR objetivou também a análise dos níveis de imunoglobulinas, a partir de um estímulo prévio e posterior desafio com promastigotas do parasita. Os resultados obtidos a partir da resposta humoral, apresentaram maiores proporções de IgG2a/IgG1 (de 0,8235/0,081 ratio, como apresentado nos resultados) e mostraram-se satisfatórios dentro do esperado como resposta imunológica. Estudos mostraram que essa proporção é ideal para a maior intensificação da opsonização do parasita de forma eficiente promovendo a fagocitose por macrófagos, responsável pela eliminação da Leishmania, essencial para atingir a cura contra a LV. [18, 19]

Para investigar a ativação dos macrófagos, a quantificação de Óxido Nítrico e GM-CSF foi realizada, apresentando como resultado um aumento ligeiramente maior no grupo infectado quando comparado com o grupo controle imunizado. Segundo Dias *et al* [9] esse resultado pode ser atribuído a imunização proporcionada pela proteína hipotética.

Por último, a quantificação da carga parasitária dos órgãos, apresentaram uma redução significativa do parasita do grupo imunizado quando comparado com o grupo controle. Isso pode ser atribuído ao aumento das citocinas IFN-γ, IL-12, e GM-CSF. Entretanto, os dados obtidos não permitem ter um parâmetro comparativo na investigação da imunidade duradoura, dificultando uma análise da possível evolução ou involução *da L. infantum*. Nesse cenário, avaliar a parasitologia em diferentes períodos com tempo mais longo de sacrifícios, proporcionaria concluir se a vacina apresenta uma resolução contra o parasita ou apenas atrasa sua propagação, uma vez que a eliminação completa da Leishmania não foi atingível em nenhum dos modelos experimentais.[15]

A vantagem na utilização de vacinas a base de proteínas recombinantes está relacionada a sua segurança, especificidade e custos de produção. Além disso, permite o suporte de investigações e estudos adicionais tanto em relação a vacina, como também a novos métodos diagnósticos. Entretanto, encontrar um antígeno único capaz de apresentar resposta imunológica contra todas as espécies de Leismaniose continua sendo um desafio. [20, 21]

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo demonstram uma prova da eficácia de uma nova proteína hipotética de *Leishmania* para induzir uma resposta de proteção contra a Leishmaniose Visceral, quando administrada uma vacina na forma recombinante com saponina. Apesar do grande conhecimento sobre os estágios da vida da *Leishmania,* a diversidade de espécies e os diferentes tipos de respostas imunes desencadeadas, o desenvolvimento de vacinas contra a forma humana ainda constitui um grande desafio. Como os resultados para a forma animal da Leishmaniose Visceral são bastante promissores, eles sugerem a necessidade de estudos complementares com a testagem dessa molécula como imunógeno contra a doenças humanas.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Brasília: Ministério da Saúde, 2017, 1-120p.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS One 2012;7(5); e35671.
3. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 1996;34(2):257-72.

4. Herwaldt BL. Leishmaniais. Lancet 1999;354(9185);1191-99.
5. Nakamura CV, Santos AO, Vendrametto MC, Luize PS, Dias Filho BP, Cortez DA, et al. Antileishmanial activity of hydroalcoholic extract and fractions obtained from leaves of Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.). Revista Brasileira de Farmacognosia 2006;16(1):61-66.
6. Brasil. Nota Informativa Nº 24/2019 - CGDT/DEVIT/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, 1-4p.
7. Zuben APBV, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cadernos de Saúde Pública 2016;32(6); e00087415.
8. Grimald GJ, Teva A, dos-Santos CB, Santos FN, Pinto IS, Fux B. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum in an endemic area with high transmission rates. PLoS One 2017;12(9); e0185438.
9. Dias DS, Ribeiro PA, Martins VT, Lage DP, Ramos FF, Dias AL, et al. Recombinant Prohibitin Protein of Leishmania Infantum Acts as a Vaccine Candidate and Diagnostic Marker Against Visceral Leishmaniasis. Cellular immunology 2018;323:59-69.
10. Piarroux R, Azaiez R, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, et al. Isolation and Characterization of a Repetitive DNA Sequence From Leishmania Infantum: Development of a Visceral Leishmaniasis Polymerase Chain Reaction. The American jornal of tropical medicine and hygiene 1993;49(3):364-69.
11. Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Martins AM, Lage PS, Lage DP, et al. Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 2013;7(3); e2148.
12. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. Parasites & vectors 2016;9(1):277.
13. Lage DP, Ludolf F, Silveira PC, Machado AS, Ramos FF, Dias DS, et al. Screening diagnostic candidates from Leishmania infantum proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. Parasitology 2019;146(11):1467-76.
14. Ali N, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Reis AB. Targeted immunology for prevention and cure of VL. Frontiers in immunology 2014;5:660.
15. Ribeiro PA, Dias DS, Novais MV, Lage DP, Tavares GS, Mendonça DV, et al. A Leishmania hypothetical protein-containing liposome-based formulation is highly immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. Cytokine 2018;111:131-39.
16. Barbosa Santos ML, Nico D, de Oliveira FA, Barreto AS, Palatnik-de-Sousa I, Carrillo E, et al. Leishmania donovani nucleoside hydrolase (NH36) domains induce T-cell cytokine responses in human visceral leishmaniasis. Frontiers in Immunology 2017;8:227.
17. Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Duarte MC, Lage DP, Lima MI, et al. Phage-fused epitopes from Leishmania infantum used as immunogenic vaccines confer partial protection against Leishmania amazonensis infection. Parasitology 2015;142:1335–47.
18. Agallou M, Athanasiou E, Koutsoni O, Dotsika E, Karagouni E. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I-and II-restricted epitopes of four known Leishmania infantum proteins. Frontiers in immunology 2014; 10;5:268.
19. Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Garde E, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, et al. Prophylactic properties of a Leishmania-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. Parasite Immunology 2015;37(12):646-56.
20. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nature medicine 2013;19(12):1597-1608.
21. Chen WH, Hotez PJ, Bottazzi ME. Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2020;16(6):1239-42.