

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tatiane dos Santos

**TESTE TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DA  
VACINA ANTI-HELMÍNTICA BASEADA NO ANTÍGENO r-Sm14 DE  
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Rio de Janeiro  
2012

**Tatiane dos Santos**

**TESTE TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DA  
VACINA ANTI-HELMÍNTICA BASEADA NO ANTÍGENO r-Sm14 DE  
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Dra. Miriam Tandler  
Dr. Fábio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Santos, Tatiane dos

Teste toxicológico pré-clínico para o desenvolvimento da vacina anti-helmíntica baseada no antígeno r-Sm14 de *Schistosoma mansoni* / Tatiane dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

143 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientador: Miriam Tendler e Fábio Coelho Amendoeira

1. Vacinas. 2. Anticorpos Anti-Helmínticos. 3. Antígenos de Helminhos. 4. *Schistosoma mansoni*. 5. Toxicologia. I.Título.

Pre-clinical toxicology test for the development of anthelmintic vaccine based on r-Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni*.

**Tatiane dos Santos**

**TESTE TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DA  
VACINA ANTI-HELMÍNTICA BASEADA NO ANTÍGENO r-Sm14 DE  
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em 19/03/2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Dra. Patrícia Machado Pinto  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida  
Universidade Federal Fluminense

---

Dra. Miriam Tandler - Orientadora  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio Coelho Amendoeira – Orientador  
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

Àqueles responsáveis por tudo que sou e conquistei até hoje – minha mãe Alzira e meu pai Nivaldo, com todo amor e carinho.

À minha querida amiga, irmã e mãe científica Dra. Patrícia Machado Pinto, sem você nada teria sido possível, para sempre minha gratidão.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua constante presença na minha vida através de possibilidades, facilidades e oportunidades que tenho.

À Fundação Oswaldo Cruz, por me oferecer tantos recursos e oportunidades para executar os trabalhos e contribuir para a ciência.

À Dra. Miriam Tendler, mestre e orientadora dessa dissertação, exemplo de perseverança e crença no trabalho, obrigada pela oportunidade, apoio, confiança, incentivo e pelos conhecimentos compartilhados que me proporcionaram desenvolvimento intelectual.

Ao Dr. Fábio Coelho Amendoeira, orientador dessa dissertação, pela confiança em mim e apoio ao projeto, pelos ensinamentos que contribuíram para o meu aprendizado científico.

À equipe da Secretaria de Pós-graduação do INCQS, pelo apoio acadêmico, em especial à ex-coordenadora Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Tininha), que se empenhou na solução das minhas dificuldades, resultando na possibilidade de conclusão deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa através do INCQS/Fiocruz.

Ao Laboratório de Esquistossomose Experimental do IOC pela infraestrutura técnico-científica fornecida e pelo suporte financeiro para realização da pesquisa. À equipe de funcionários do Laboratório de Esquistossomose Experimental do IOC, em especial à aqueles que me ajudaram diretamente em diferentes etapas do presente trabalho.

Aos funcionários do CECAL/Fiocruz, em especial ao médico veterinário Dr. Sebastião Enes Couto, pelo fornecimento dos animais utilizados nos experimentos.

À equipe de funcionários dos Biotério de Experimentação Animal do Pavilhão Cardoso Fontes e Pavilhão Lauro Travassos, em especial ao médico veterinário Dr. Carlos Müller, pelo cuidado com os coelhos durante o experimento sendo dedicados e atenciosos apesar de toda sobrecarga de trabalho.

Ao Dr. Pedro Cabello, professor Sérgio Alves da Silva e ao Ronaldo de Carvalho Augusto pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida, médica veterinária/patologista, pelo grandioso auxílio na interpretação dos resultados anatomopatológicos e pela colaboração na montagem das lâminas de histologia, na realização das fotomicrografias e na análise confocal das lâminas, sempre com atenção e gentileza.

Ao Laboratório de Patologia/Plataforma de Microscopia Confocal, especialmente ao Igor José da Silva, pelo auxílio na realização das fotomicrografias.

Aos funcionários da Biblioteca do INCQS, especialmente ao Alexandre pelo auxílio na formatação geral deste trabalho.

À Ana Maria Pereira Duarte, amiga e incentivadora, obrigada pelo apoio e palavras confortantes nas horas de necessidade e otimismo transmitido durante a realização deste trabalho.

À Dra. Clélia Christina C. Mello-Silva, amiga, que tanto me incentivou a participar do curso de pós-graduação do INCQS, obrigada por seu apoio, conversas e constantes trocas.

Ao Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa, pela amizade, conversas, pelos valorosos ensinamentos, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Wendell e Janaína, meus amigos, que mesmo distantes estiveram sempre comigo, me estimulando e acreditando que eu estava escolhendo o meu melhor caminho. Obrigada principalmente por terem cuidado de nossos pais nos momentos em que estive ausente.

Às queridas amigas Renata Borges e Patrícia Costa, que mesmo à distância mantiveram o contato e preservaram nossa preciosa amizade. Sempre preocupadas com meu bem estar no Rio de Janeiro e com a dissertação, obrigada pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus amigos, especialmente o Keko e toda família Trancoso, que sempre me incentivaram na concretização de mais este sonho.

À todos da minha família que de alguma forma contribuíram para esta conquista, especialmente as minhas primas Irene, Luciana e Darci pela acolhida tão generosa no Rio de Janeiro.

Aos animais que deram suas vidas em contribuição à pesquisa.

À todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização dessa dissertação.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, Alzira e Nivaldo, pelo amor, carinho, constante apoio e compreensão pelos tantos momentos ausentes. Meus queridos pais, vocês são exemplos de vida e sabedoria para seus filhos, obrigada pelo incentivo e por terem sempre me apoiado nas minhas decisões. Vocês são meu porto seguro, meus companheiros em todos os momentos da minha vida, me proporcionando carinho, dedicação, amor e estímulo.

Um agradecimento muito especial à minha querida amiga, irmã e mãe científica Dra. Patrícia Machado Pinto. Obrigada por ter me acolhido no Rio de Janeiro fazendo de sua família, especialmente a Nicole e o Rodrigo, hoje a minha segunda família. Obrigada por acreditar em mim, pela confiança, por tanto me incentivar a participar de um programa de pós-graduação, pelos conselhos, dedicação, convívio, ensinamentos que com certeza fizeram de mim uma profissional melhor e por sua amizade incondicional. Não tenho palavras para agradecer tudo que você fez por mim com tanto carinho, amor e respeito.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”.

Albert Einstein

## RESUMO

Para avaliação dos parâmetros de segurança do preparado vacinal r-Sm14 contra a esquistossomose, testes pré-clínicos e clínicos devem ser realizados. O presente estudo tem por objetivo avaliar a segurança do antígeno recombinante Sm14 e do adjuvante LIPID-A (GLA) quando administrado em coelhos subcutaneamente utilizando múltiplas doses. O teste toxicológico do antígeno vacinal r-Sm14 foi realizado de acordo com o protocolo toxicológico adotado e desenvolvido por BAS Evansville e Corixa Corporation (2002), segundo as normas do FDA Good Laboratory Practice Regulations (21CFR Part 58) e CPMP guidance documents (CPMP/SWP/465/95 E CPMP/ICH302/95). Neste estudo, 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, sendo 12 machos e 12 fêmeas foram distribuídos em 4 grupos. Cada grupo foi composto por três coelhos machos e três fêmeas imunizados com antígeno r-Sm14 expresso em *Pichia pastoris* (Grupo A/Sm14Pp+GLA), antígeno r-Sm14 expresso em *Escherichia coli* (Grupo B/Sm14Ec + GLA), adjuvante GLA-SE (Grupo C) e PBS (Grupo D/controle). Foram avaliados diariamente o aspecto físico dos animais, o nível de estresse, consumo de alimentos e água; semanalmente, variação da evolução ponderal; e, antes e após as inoculações, por meio de sangrias, parâmetros bioquímicos e hematológicos. Ao final do teste todos os animais foram eutanasiados para investigação anatomopatológica. Os animais não apresentaram mudanças significativas no aspecto físico e no nível de estresse. Não houve diferença de peso estatisticamente significativa entre os grupos e todos os resultados encontrados estão de acordo com os dados fisiológicos esperados para coelhos. Os pesos de todos os órgãos e estruturas e a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados se encontravam dentro da normalidade. A análise anatomopatológica evidenciou ausência de alterações macroscópicas e histopatológicas significativas na pele do local das imunizações e em todos os órgãos analisados. Alguns animais, inclusive do grupo controle, apresentaram pequenos focos de calcificação nos rins, comuns em coelhos, associados às condições nutricionais. Portanto, nenhum dado indicativo de qualquer ação tóxica provocada pela imunização com diferentes formulações da proteína r-Sm14 e/ou adjuvante foi encontrado, demonstrando uma completa segurança do preparado vacinal, dentro das condições experimentais apresentadas.

Palavras chave: r-Sm14. GLA. Preparado vacinal. Esquistossomose. Segurança.

## ABSTRACT

To assess the safety parameters for preparing a vaccine against schistosomiasis from recombinant r-Sm14, pre-clinical and clinical tests must be carried out. The aim of this study was to evaluate the safety of the r-Sm14 antigen and the adjuvant LIPID-A (GLA) when administered subcutaneously to rabbits in multiple doses. The toxicological test of the vaccine antigen r-Sm14 was performed according to the protocol developed and adopted by BAS Evansville and Corixa Corporation (2002), according to the standards of the FDA Good Laboratory Practice Regulations (21CFR Part 58) and the CPMP guidance documents (CPMP/SWP/465/95 and CPMP/ICH302/95). A total of 24 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of the New Zealand breed were used (12 males and 12 females), distributed in four groups. Each group was composed of three males and three females, immunized with the r-Sm14 antigen expressed in *Pichia pastoris* (Group A/Sm14Pp+GLA), the r-Sm14 antigen expressed in *Escherichia coli* (Group B/Sm14Ec + GLA), the adjuvant GLA-SE (Group C) and PBS (Group D/control). The animals' physical appearance, stress level and food and water consumption were assessed daily, while the weight evolution was measured weekly. Finally, the biochemical and hematological parameters were analyzed by means of blood tests before and after the inoculations. At the end of the test, all the animals were euthanized for anatomopathological examination. The animals did not show significant changes in physical appearance and stress level. There also was no significant weight difference among the groups and all the data were in accordance with the physiological data expected for rabbits. The weights of all the organs and structures and the majority of the biochemical and hematological parameters analyzed were within the normal range. The anatomopathological examination revealed the absence of macroscopic and histopathological changes in the skin at the vaccination site and in all the organs analyzed. Some animals, including in the control group, presented small calcification foci in the kidneys, common in rabbits, associated with the nutritional conditions. Therefore, no signs of any toxic action caused by the immunization with the different formulations of the protein r-Sm14 and/or adjuvant were found, demonstrating the complete safety of the vaccine preparation, under the described experimental conditions.

Key words: r-Sm14, GLA. Vaccine preparation. Schistosomiasis. Safety.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Mapa esquemático da distribuição global da esquistossomose .....  | 21 |
| <b>Figura 2</b>  | Mapa esquemático da distribuição da esquistossomose no Brasil .....   | 22 |
| <b>Figura 3</b>  | Ciclo de transmissão de <i>Schistosoma mansoni</i> .....  | 25 |
| <b>Figura 4</b>  | Processo de identificação do antígeno Sm14 .....  | 34 |
| <b>Figura 5</b>  | Modelagem Molecular da proteína Sm14 .....  | 35 |
| <b>Figura 6</b>  | Identificação através da tatuagem na orelha do animal .....   | 47 |
| <b>Figura 7</b>  | Cartão de identificação das gaiolas .....   | 48 |
| <b>Figura 8</b>  | Estrutura do adjuvante GLA .....  | 49 |
| <b>Figura 9</b>  | Coelho com dorso tricotomizado .....  | 51 |
| <b>Figura 10</b> | Desenho esquemático dos locais das inoculações .....  | 51 |
| <b>Figura 11</b> | Inoculação do preparado vacinal .....   | 51 |
| <b>Figura 12</b> | Exame oftalmológico .....   | 52 |
| <b>Figura 13</b> | Procedimento de eutanásia nos coelhos .....   | 55 |
| <b>Figura 14</b> | Resumo esquemático do protocolo de avaliação toxicológica do antígeno r-Sm14 e adjuvante LIPID A (GLA) em coelhos ..... | 57 |
| <b>Figura 15</b> | Níveis séricos de uréia .....   | 63 |
| <b>Figura 16</b> | Níveis séricos de creatinina .....  | 64 |
| <b>Figura 17</b> | Níveis séricos de amilase .....   | 66 |
| <b>Figura 18</b> | Níveis séricos de glicose .....   | 68 |
| <b>Figura 19</b> | Níveis séricos de cálcio .....  | 70 |
| <b>Figura 20</b> | Níveis séricos de fósforo .....   | 71 |
| <b>Figura 21</b> | Níveis séricos de cloro .....   | 74 |
| <b>Figura 22</b> | Níveis séricos de potássio .....  | 75 |
| <b>Figura 23</b> | Níveis séricos de sódio .....   | 76 |

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Figura 24</b> | Níveis séricos de proteínas totais (PT).....                         | 79  |
| <b>Figura 25</b> | Níveis séricos de albumina .....                                     | 80  |
| <b>Figura 26</b> | Níveis séricos de globulina .....                                    | 81  |
| <b>Figura 27</b> | Relação albumina/globulina.....                                      | 82  |
| <b>Figura 28</b> | Níveis séricos de colesterol.....                                    | 85  |
| <b>Figura 29</b> | Níveis séricos de triglicerídeos .....                               | 86  |
| <b>Figura 30</b> | Níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK).....                     | 88  |
| <b>Figura 31</b> | Níveis séricos transaminase pirúvica (TGP).....                      | 91  |
| <b>Figura 32</b> | Níveis séricos de transaminase oxalacética (TGO).....                | 92  |
| <b>Figura 33</b> | Níveis séricos de fostasase alcalina .....                           | 93  |
| <b>Figura 34</b> | Níveis séricos de bilirrubina total .....                            | 95  |
| <b>Figura 35</b> | Contagem de Hemácias.....  | 99  |
| <b>Figura 36</b> | Níveis de hemoglobina.....   | 100 |
| <b>Figura 37</b> | Níveis de Hematócrito .....  | 102 |
| <b>Figura 38</b> | Níveis de volume corpuscular médio (MCV).....                        | 105 |
| <b>Figura 39</b> | Níveis de hemoglobina corpuscular média (MCH) .....                  | 106 |
| <b>Figura 40</b> | Concentração média de hemoglobina (MCHC).....                        | 107 |
| <b>Figura 41</b> | Níveis de plaquetas .....  | 109 |
| <b>Figura 42</b> | Níveis de reticulócitos.....   | 111 |
| <b>Figura 43</b> | Níveis de leucócitos (WBC) .....                                     | 114 |
| <b>Figura 44</b> | Níveis de linfócitos .....   | 115 |
| <b>Figura 45</b> | Níveis de Neutrófilos .....  | 116 |
| <b>Figura 46</b> | Determinação dos tempos de protrombina (PTB).....                    | 120 |
| <b>Figura 47</b> | Determinação dos tempos de trombolastina (PTT).....                  | 121 |
| <b>Figura 48</b> | Fotomicrografia de corte histológico de tecido renal de coelho ..... | 124 |

**Figura 49** Macroscopia da pele dos coelhos demonstrando os locais de aplicação das injeções (A) e a coleta de amostras destes locais para exame histopatológico (B) ..... 125

**Figura 50** Fotomicrografia de corte histológico de pele de coelho ..... 125

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1</b> Proteção induzida e principais características dos candidatos prioritários à vacina contra a esquistossomose..... | 29  |
| <b>Quadro 1</b> Lista de FABPs de parasitas depositadas no banco de dados UNIPROT .....   | 37  |
| <b>Tabela 2</b> Avaliação do peso corporal dos coelhos (Kg) do dia 0 ao dia 51 do estudo .....                                    | 61  |
| <b>Quadro 2</b> Resumo dos resultados bioquímicos em relação ao controle e tempo .....  | 96  |
| <b>Quadro 3</b> Resumo dos resultados hematológicos em relação ao controle e tempo.....   | 117 |
| <b>Quadro 4</b> Resumo dos resultados dos parâmetros de coagulação em relação ao controle e tempo.....                            | 122 |
| <b>Tabela 3</b> Resultados Anatomopatológicos .....   | 127 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| ACF     | Adjuvante Completo de Freund                                      |
| ALP     | Fosfatase Alcalina  |
| ANOVA   | Análise de Variância de Uma Via                                   |
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                          |
| BPL     | Boas Práticas de Laboratório                                      |
| CDC     | Centers for Disease Control and Prevention                        |
| cDNA    | DNA Complementar (Complementary DNA)                              |
| CECAL   | Centro de Criação de Animais de Laboratório                       |
| CEUA    | Comissão de Ética em Pesquisa com Animais                         |
| COBEA   | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal                       |
| CK      | Creatinofosfoquinase  |
| CNS     | Conselho Nacional de Saúde  |
| DALY    | Disability Adjusted Life Years                                    |
| DTH     | Delayed Type Hypersensitivity Reaction                            |
| EDTA    | Ácido Etilenodiamino Tetracético                                  |
| EMEA    | Agência Européia para Avaliação de Produtos Medicinais            |
| EP      | Erro Padrão   |
| FABP    | Proteína Ligadora aos Ácidos Graxos (fatty acid-binding proteins) |
| FDA     | Food and Drug Administration                                      |
| FINEP   | Financiadora de Estudos e Projetos                                |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz   |
| GLA     | Glucopyranosyl Lipid Adjuvant                                     |
| GLA-SE  | Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-Stable Emulsion                     |
| GMP     | Good Manufacturing Practice                                       |
| ICH     | Comitê Internacional sobre Harmonização                           |
| IDRI    | Infectious Diseases Research Institute                            |
| IL-10   | Interleucina 10   |
| IMAC    | Cromatografia de afinidade a metal imobilizado                    |
| INCQS   | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde              |
| IOC     | Instituto Oswaldo Cruz  |
| IPEC    | Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas                    |
| kDa     | Kilo Dalton   |

|          |  |
|----------|--|
| LEE      | Laboratório de Esquistossomose Experimental  |
| LICR     | Instituto Ludwig de Pesquisas para o Câncer  |
| MAPA     | Ministério de Abastecimento Agricultura e Pecuária                                     |
| MCH      | Hemoglobina Corpuscular Média  |
| MCHC     | Concentração Média de Hemoglobina  |
| MCV      | Volume Corpuscular Médio   |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul   |
| MPL      | Monophosphoryl Lipid A   |
| MS       | Ministério da Saúde  |
| mRNA     | RNA mensageiro (Messenger RNA)   |
| NMR      | Ressonância Magnética Nuclear  |
| NRC      | National Research Council  |
| NTP      | Programa Nacional de Toxicologia (National Toxicology Program)                         |
| OECD     | Organization for Economic Cooperation and Development                                  |
| ORF      | Open Reading Frame   |
| PBS      | Solução Salina Tamponada por Fosfato (Phosphate Buffer Saline)                         |
| PBMC     | Peripheral Blood Mononuclear Cell  |
| pH       | Potencial Hidrogeniônico   |
| PB       | Parâmetro Bioquímico   |
| PC       | Parâmetro de Coagulação  |
| PH       | Parâmetro Hematológico   |
| PT       | Proteínas Totais   |
| PTB      | Protrombina  |
| PTT      | Tempo de Tromboplastina  |
| RDC      | Resolução da Diretoria Colegiada   |
| RIBI     | adjuvante composto por MPL (Monophosphoril Lipid A) + TDM (Trehalose Dicorynomycolate) |
| SDS-PAGE | Denaturing Polyacrilamide Gel Electrophoresis  |
| SE       | Extrato Solúvel de Vermes de <i>S. mansoni</i> (soluble extract)                       |
| SPF      | Specific Pathogen Free   |
| SVS      | Secretaria de Vigilância em Saúde  |
| TDM      | Trehalose Dicorynomycolate   |
| TDR      | Special Programme for Research and Training  |
| TGO      | Transaminase Oxalacética   |

|              |   |
|--------------|---|
| TGP          | Transaminase Pirúvica                                 |
| Th1          | Células T-helper do tipo 1 (patógenos intracelulares) |
| Th2          | Células T-helper do tipo 2 (patógenos extracelulares) |
| TLR-4        | Toll Like Receptor – 4                                |
| TNF $\alpha$ | Interferon alfa                                       |
| TNF $\gamma$ | Interferon gama                                       |
| TPI          | Triose-Fosfato Isomerase                              |
| UNDP         | United Nations Development Programme                  |
| UNIPROT      | Universal protrecurso                                 |
| WBC          | White Blood Cells                                     |
| WHO          | World Health Organization                             |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 21 |
| 1.1 ESQUISTOSSOMOSE .....   | 21 |
| 1.2 BIOLOGIA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> .....  | 24 |
| 1.3 VACINAS ANTI-ESQUISTOSSOMOSE.....   | 26 |
| 1.3.1 Candidatos vacinais para a esquistossomose.....   | 27 |
| 1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS REALIZADOS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DA VACINA CONTRA ESQUISTOSSOMOSE: SM14..... | 31 |
| 1.4.1 Identificação da proteína Sm14 de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                    | 33 |
| 1.5 MODELAGEM MOLECULAR .....   | 35 |
| 1.6 A HISTÓRIA DO ANTÍGENO SM14 COMO UM CANDIDATO A VACINA ANTI-HELMÍNTICA .....                            | 36 |
| 1.6.1 A proteína Sm14 como vacina anti-helmintica bivalente contra esquistossomose e fasciolose .....       | 38 |
| 1.7 PERSPECTIVAS PARA COMERCIALIZAÇÃO: UMA REDE DE PARCERIA PÚBLICO/PRIVADA .....                           | 40 |
| 1.8 CONDUÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA PARA VACINAS..  | 41 |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....  | 44 |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....  | 45 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....   | 45 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 45 |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 46 |
| 4.1 ANIMAIS .....   | 46 |
| 4.1.1 Alimentação.....  | 47 |
| 4.1.2 Identificação dos animais .....   | 47 |
| 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....  | 48 |
| 4.2.1 Antígenos vacinais.....   | 48 |
| 4.2.1.1 <i>Sm14</i> expresso em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 48 |
| 4.2.1.2 <i>Sm14</i> expresso em <i>Escherichia coli</i> .....   | 48 |
| 4.2.2 Adjuvante .....   | 48 |
| 4.2.3 Formulação do antígeno vacinal Sm14 e o adjuvante GLA-SE.....   | 49 |
| 4.3 PROTOCOLO DE VACINAÇÃO .....  | 50 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.1 Exame oftalmoscópico .....   | 52  |
| 4.3.2 Avaliação clínica .....  | 52  |
| 4.3.3 Evolução ponderal .....  | 53  |
| 4.3.4 Análises laboratoriais .....   | 53  |
| 4.3.4.1 <i>Parâmetros bioquímicos</i> .....  | 54  |
| 4.3.4.2 <i>Parâmetros de hematológicos</i> .....   | 54  |
| 4.3.4.3 <i>Parâmetros de coagulação</i> .....  | 54  |
| 4.3.5 Avaliação sistêmica anatomopatológica .....  | 55  |
| 4.3.5.1 <i>Procedimento para necropsia</i> .....   | 55  |
| 4.3.5.2 <i>Método de eutanásia</i> .....   | 55  |
| 4.3.5.3 <i>Órgãos e tecidos coletados</i> .....  | 56  |
| 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 58  |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | 59  |
| 5.1 ANÁLISE OFTALMOLÓGICA .....  | 59  |
| 5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA .....  | 59  |
| 5.3 EVOLUÇÃO PONDERAL .....  | 60  |
| 5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....   | 62  |
| 5.4.1 Uréia e creatinina .....   | 62  |
| 5.4.2 Amilase .....  | 65  |
| 5.4.3 Glicose .....  | 67  |
| 5.4.4 Cálcio e fósforo .....   | 69  |
| 5.4.5 Cloro, potássio e sódio .....  | 72  |
| 5.4.6 Proteínas totais, albumina, globulina e relação albumina/globulina .....   | 77  |
| 5.4.7 Colesterol e triglicerídeos .....  | 83  |
| 5.4.8 Creatinofosfoquinase (CK) .....  | 87  |
| 5.4.9 Transaminase pirúvica, transaminaseoxaloacética e fosfatase alcalina .....   | 89  |
| 5.4.10 Bilirrubina total .....   | 94  |
| 5.5 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS .....   | 97  |
| 5.5.1 Contagem de hemácias e hemoglobina .....   | 97  |
| 5.5.2 Hematócrito .....  | 101 |
| 5.5.3 Volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH),<br>concentração média de hemoglobina (MCHC) ..... | 103 |
| 5.5.4 Plaquetas .....  | 108 |
| 5.5.5 Reticulócitos .....  | 110 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.5.6 Leucócitos (WBC- white blood cells), linfócitos e neutrófilos .....             | 112 |
| 5.6 PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO .....  | 118 |
| 5.6.1 Protrombina (PTB) e Tempo de Tromboplastina (PTT) .....                         | 118 |
| 5.7 RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS .....   | 123 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....  | 128 |
| <b>7 CONCLUSÃO</b> .....  | 133 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 134 |
| <b>APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ESTRESSE E ASPECTO FÍSICO DOS COELHOS</b> ..... | 143 |

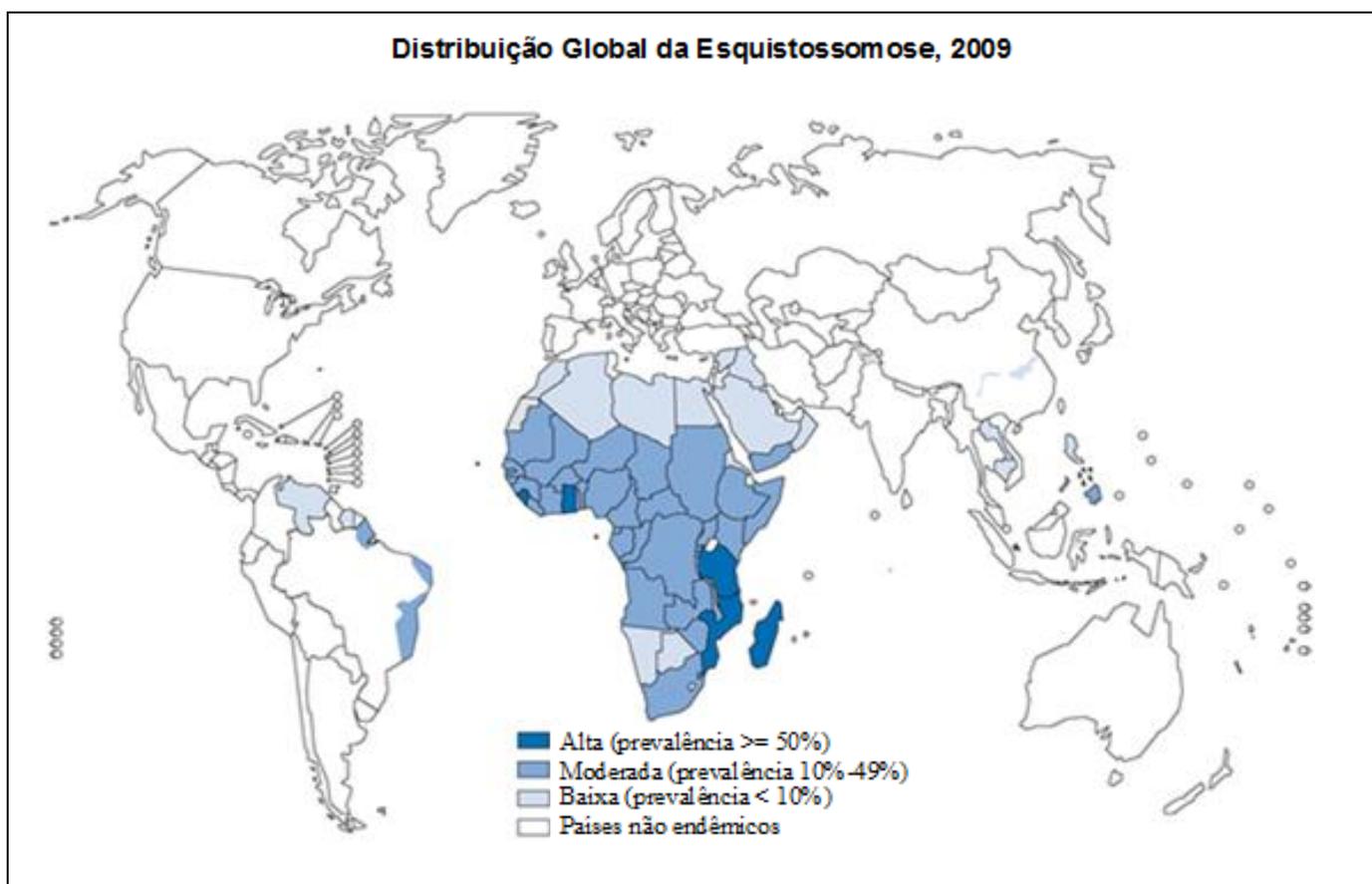
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante, associada à pobreza, às baixas condições socioeconômicas da população e à falta de saneamento básico e de água tratada. É considerada um importante problema de saúde pública em várias partes do mundo, particularmente no continente africano (WHO, 2011a).

Apesar de esforços para controle, atualmente são estimadas pelo menos 240 milhões de pessoas infectadas e mais de 700 milhões de pessoas, em 76 países endêmicos, em risco de infecção (WHO, 2011a). A distribuição da doença está demonstrada na figura 1.

Figura 1 - Mapa esquemático da distribuição global da esquistossomose

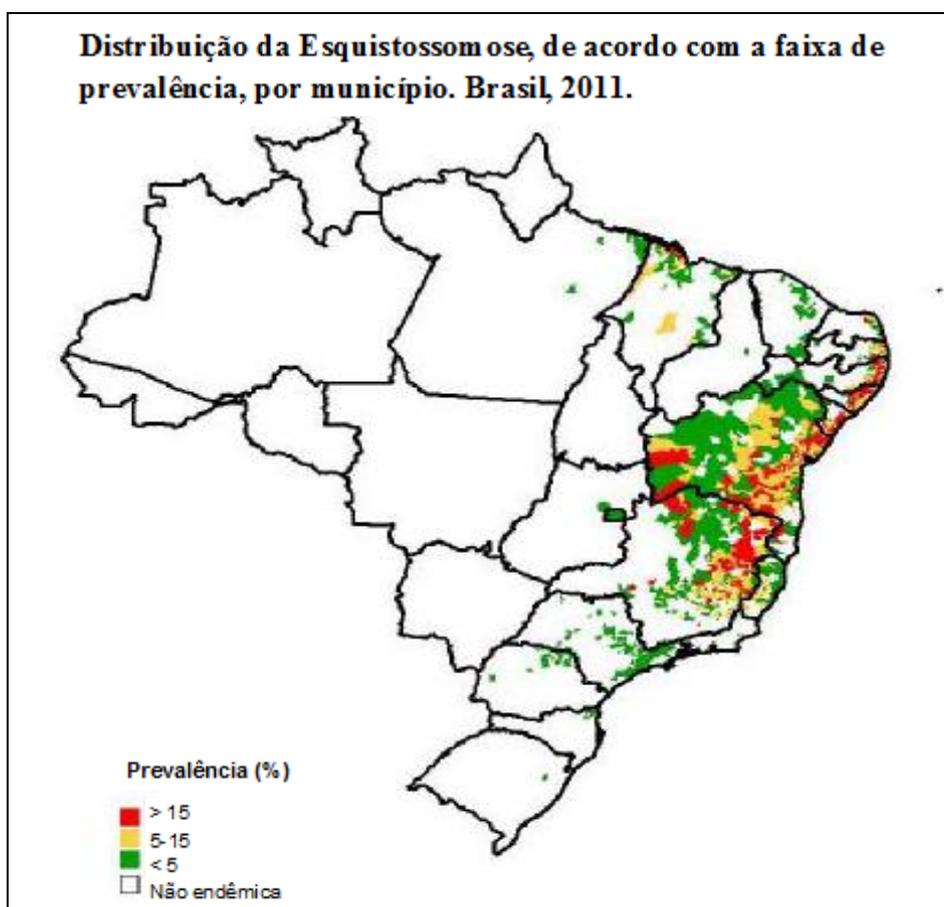


Fonte: Modificado de WHO 2011b

No Brasil, estima-se que 6 milhões de indivíduos estejam infectados e 25 milhões em risco de contrair a doença. A área endêmica para esquistossomose abrange os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas

Gerais. Os estados com distribuição focal são Pará, Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os índices de prevalência mais elevados ocorrem em municípios dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (BRASIL, 2009; COURA; AMARAL, 2004). De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), em 2010 foram confirmados 47.157 casos de esquistossomose no Brasil e no período de 2000 a 2010 a doença provocou em média 505 óbitos conforme a Figura 2.

**Figura 2 - Mapa esquemático da distribuição da esquistossomose no Brasil**



Fonte: BRASIL, 2011

A epidemiologia da esquistossomose mudou dramaticamente com a introdução do praziquantel há 30 anos (ENGELS et al., 2002; WHO, 2002). No entanto, a significativa redução da morbidade que se seguiu, embora representando um avanço notável, contribuiu para a espúria percepção de que a doença é um problema do passado. Essa noção foi reforçada pela sua eliminação em algumas regiões, como por exemplo, no Japão, em conjunto com as crescentes melhorias nas condições sócio-econômicas observadas em meados do século passado e a sua eliminação em algumas ilhas do Caribe, onde os principais fatores

contribuintes foram o desaparecimento do hospedeiro intermediário, o caramujo. No entanto, na maioria das áreas endêmicas, a manutenção da transmissão impede o controle de longo prazo sem reintervenção. Esse é o caso da África subsaariana em especial, mas também de regiões do Brasil, China e Filipinas, mesmo se os programas de controle existentes por lá tivessem mantido efeitos positivos e sustentáveis na maioria dos territórios (BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005).

Embora a morbidade tenha diminuído, a prevalência e a mortalidade permanecem inalteradas (ENGELS et al., 2002; WHO, 2002). Nesse cenário, uma correta avaliação da morbidade torna-se progressivamente importante para a análise do real impacto da esquistossomose. As doenças humanas são atualmente classificadas com base em índices mais justos e corretos que levam em conta não só morbidade/mortalidade, mas também o seu impacto na qualidade de vida (BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005).

Desenvolvido por cientistas da universidade de Harvard, EUA, o “Disability Adjusted Life Years”, DALY, que em português se traduz como “anos de vida com ajuste de incapacidade” (MURRAY; LOPEZ, 1996; PRUS, et al., 2002) leva em consideração o número de anos de vida saudável, livres de sintomas e ações da doença e/ou sequelas e incapacidade atreladas à doença em questão. Este índice é o mais conhecido e passou a ser adotado pela Organização Mundial da Saúde para a definição de prioridades e políticas de saúde.

A aplicação do DALY representa um avanço sobre a metodologia de avaliação anterior para doenças crônicas como as helmintoses, em particular a esquistossomose, entretanto ainda não traduz totalmente seu impacto para as populações de áreas endêmicas, na medida em que não são consideradas todas as sequelas da doença, como anemia, crescimento retardado e desenvolvimento cognitivo prejudicado (BERGQUIST, 2002; MICHAUD; GORDON; REICH, 2003). Com base no novo índice DALY que a Organização Mundial da Saúde está recalculando para a esquistossomose e outras helmintoses intestinais, é esperado que o impacto da esquistossomose humana seja equiparado ao das doenças infecciosas que hoje lideram a escala de importância mundial, como a malária e a tuberculose (TENDLER; SIMPSON, 2008).

## 1.2 BIOLOGIA DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, está representado na figura 3. A doença é transmitida para o homem através do contato com águas contaminadas por caramujos infectados. O ciclo do parasita possui estágios em hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo que nos vertebrados, vermes adultos (machos e fêmeas) vivem acasalados dentro das veias mesentéricas (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou nas vênulas do sistema urinário (*S. haematobium*) (VON LICHTENBERG, 1987). O ciclo de vida do *S. mansoni* se inicia com a eliminação dos ovos do parasito junto com as fezes do hospedeiro definitivo, que em contato com água doce, eclodem liberando os miracídios. O miracídio, forma larval de vida livre, nada ativamente até encontrar o hospedeiro intermediário, um caramujo do gênero *Biomphalaria*. Após a penetração, a larva perde o revestimento epitelial ciliado, e as demais estruturas de penetração são gradualmente substituídas até que, no segundo dia, uma nova camada superficial contínua aparece, formando, então, o esporocisto primário. No 14<sup>o</sup> dia após a penetração, o esporocisto primário formado inicialmente se enovela e aumenta de tamanho, apresentando de 150 a 200 células germinativas, as quais darão origem ao esporocistos secundários. Estes após completamente formados migram para a glandula digestiva do molusco, iniciando o desenvolvimento de cercárias (larvas infectantes para o hospedeiro vertebrado), após 30 dias de infecção (NEVES, 2005). As cercárias penetram ativamente no hospedeiro humano através da pele, perdem suas caudas bifurcadas, os glicocálices e se transformam em esquistossômulos. Após dois dias na pele, os esquistossômulos penetram em vasos linfáticos ou sanguíneos do seu novo hospedeiro, seguindo pela circulação sanguínea, sendo conduzidos para o coração e pulmões (MILLER; WILSON, 1978). Por volta do 8<sup>o</sup> dia migram para o sistema porta intra-hepático, onde se alimentam de sangue e por volta do 28<sup>o</sup> ao 35<sup>o</sup> dia após a infecção ocorre o acasalamento entre macho e fêmea. As fêmeas sofrem modificações ultraestruturais e metabólicas, sendo este fenômeno o responsável pela manutenção da maturidade sexual das fêmeas e produção de ovos (ERASMUS, 1986). Os casais então migram para os ramos terminais das veias mesentéricas, onde ocorrerá a ovoposição. Cada casal pode produzir cerca de 300 ovos por dia. Parte desses ovos, cerca de 50%, atravessa as paredes do intestino, sendo eliminados com as fezes, fechando o ciclo de vida do parasita. Os demais ovos permanecem na corrente sanguínea e podem se depositar em diversos órgãos. Na maioria das vezes são levados até os capilares hepáticos, tornando-se focos de reações inflamatórias com formação de granuloma.

As lesões fibróticas crônicas, que se formam ao redor dos ovos retidos no fígado, são as mais importantes complicações da infecção, sendo responsáveis por efeitos tardios como obstrução venosa, hepatomegalia e ascite (CHEEVER, 1992; VON LICHTENBERG, 1987).

A reação do hospedeiro contra o ovo caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade de tipo tardio (delayed-type hypersensitivity reaction, DTH). O ovo fica cercado de um infiltrado denso, composto principalmente de linfócitos, macrófagos e de um número variável de eosinófilos, todos contidos numa matriz extracelular, formando o granuloma. Evidências indicam que a reação periovular é predominantemente do tipo Th2, caracterizando uma DTH do tipo Th2 (CHEEVER, 1992).

Figura 3 - Ciclo de transmissão de *Schistosoma mansoni*



Fonte: SCHALL et al. 2007

### 1.3 VACINAS ANTI-ESQUISTOSSOMOSE

Os programas dirigidos para o controle da esquistossomose são ainda feitos com drogas, como o praziquantel em combinação com outras medidas de fraco impacto, como tentativas de controle dos caramujos vetores da doença, educação e a instalação de sistemas de água-esgoto nas regiões rurais, que são as áreas mais atingidas. Porém, com o estabelecimento de sistemas de irrigação e represas, surgiram novos “*habitat*” para os caramujos vetores da doença, expandindo as regiões de transmissão da esquistossomose. Por outro lado, com a migração da população de regiões endêmicas para as cidades, a esquistossomose está se tornando também um mal urbano. A quimioterapia é aplicada de modo terapêutico para curar a doença, é custosa e não confere resistência em longo prazo, observando-se casos de reinfecção, principalmente em crianças e jovens. No entanto, uma vacina seria preventiva e se aplicaria em combinação com a quimioterapia. Além disso, esta vacina poderia ser implementada nos programas de vacinação já existentes, principalmente em crianças, reduzindo o custo de tratamento e dando uma solução em longo prazo (TENDLER; SIMPSON, 2008).

A vacinação é um poderoso meio de proteção dos seres humanos contra as doenças transmissíveis e produziu grande impacto na saúde pública mundial, sendo também o recurso de melhor relação custo-benefício, no controle dessas doenças. Com exceção da água potável, nenhum outro recurso, nem mesmo os antibióticos, tiveram um efeito tão grande na diminuição da mortalidade e no crescimento populacional (PLOTKIN; MORTIMER, 1994). A vacinação já controlou nove das principais doenças infecciosas mundialmente endêmicas: varíola, difteria, tétano, febre amarela, coqueluche, poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola. No caso da varíola, o sonho da erradicação foi concretizado (MMWR, 1999b).

Quando se protege um indivíduo, através da vacinação, conseqüentemente se está ajudando a proteger também a comunidade, através da redução da disseminação do agente etiológico. Sabe-se que atingindo um alto nível de imunidade em uma população, pode-se interromper a transmissão do agente infeccioso nesta população, mesmo que não se tenha atingido um nível de 100% de imunização. Um exemplo clássico foi à erradicação da varíola e da poliomielite em diversos países (MMWR, 1999b; PLOTKIN; MORTIMER, 1994). Além disso, a vacinação é o melhor meio profilático no que diz respeito à relação custo-benefício. Como alguns exemplos, podemos citar dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC): No ano de 1994, cada dólar gasto com a administração da vacina oral contra poliomielite economizou \$3.40 de custos médicos diretos e \$2.74 de custos sociais indiretos.

No mesmo ano, cada dólar gasto na vacinação contra o sarampo, possibilitou uma economia de \$10.30 em custos médicos diretos e \$3.20 em custos sociais indiretos (MMWR, 1999a).

A existência de uma proteção parcial, em indivíduos vivendo em área endêmica, adquirida ao longo da vida, assim como trabalhos demonstrando a obtenção de altos níveis de proteção em animais inoculados com cercárias atenuadas por doses subletais de radiação, demonstra ser viável o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose (BERGQUIST, 1995, 1997; BERGQUIST; COLLEY, 1998; BUTTERWORTH, 1984; GRYSEELS, 1994). No caso da esquistossomose, mesmo uma vacina parcialmente protetora seria benéfica, visto que o parasita não se reproduz no hospedeiro mamífero e a morbidade está correlacionada com a carga parasitária (BERGQUIST; COLLEY, 1998; SMITHERS; TERRY, 1965, 1969; TARRAB-HAZDAI; SCHECHTMAN; ARNON, 1998).

Embora exista, ainda hoje, movimentos anti-vacina que tentam privilegiar o uso de drogas, vários trabalhos suportam a viabilidade de vacinação eficiente contra diferentes espécies de helmintos e protozoários. Uma das principais forças de mercado atuais são as políticas européias na área da veterinária e doenças parasitárias do gado de consumo, que rejeitam as drogas anti-helmínticas usadas para tratar as helmintoses do gado, como a fasciolose (TENDLER; SIMPSON, 2008). Com relação a esquistossomose e outras helmintoses é importante salientar que se usa em humanos, as mesmas drogas que devem ser substituídas por vacinas.

### 1.3.1 Candidatos vacinais para a esquistossomose

Avanços na área da biotecnologia têm favorecido o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas. Países em desenvolvimento, basicamente países tropicais, possuem uma alta prevalência de doenças parasitárias como a malária, leishmaniose e a esquistossomose e o desenvolvimento dessas vacinas só agora estão sendo priorizadas (ENGERS et al., 1996).

Com o apoio de milhões de dólares que vêm sendo globalmente investidos no desenvolvimento biotecnológico, dezenas de antígenos candidatos à vacina contra a esquistossomose, efetivamente, emergiram nas últimas décadas, de inúmeros projetos científicos pelo mundo (BERGQUIST et al., 2002).

Nos anos 90, o Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais TDR (Tropical Disease Research) da WHO criou mecanismos especiais para promover o efetivo desenvolvimento de vacinas contra algumas das principais doenças parasitárias endêmicas negligenciadas como a malária, leishmaniose e esquistossomose. Estes programas

se basearam no estabelecimento de estratégias de fomento para a efetiva conclusão de seus objetivos de produzir vacinas contra estas doenças e de incentivar que projetos inovadores se tornassem mais efetivos no contexto do desenvolvimento de produtos. Foram estabelecidas as premissas e estratégias do programa, bem como os parceiros para as diferentes etapas (BERGQUIST; COLLEY, 1998).

Uma das premissas do programa para o desenvolvimento de vacina contra a esquistossomose da Organização Mundial de Saúde foi à determinação de patamares experimentais para a seleção dos antígenos mais promissores para uma vacina. Neste contexto, a WHO definiu que uma vacina contra a esquistossomose deveria ser capaz de induzir pelo menos 40% de proteção em modelos experimentais de hospedeiros. Este valor representa a redução de 40% do número de vermes adultos da carga infectante resultante da desafio em relação aos controles não vacinados. Posteriormente, o *Steering Committee on Vaccine for Schistosomiasis* do *Special Programme for Research and Training* (TDR) da Organização Mundial da Saúde priorizou um grupo de antígenos (Tabela 1), tais como: a glutationa-S-transferase (Sm28GST), uma enzima de 28 kDa do esquistossomo da fase adulta; a paramiosina (Sm97), uma proteína de músculo de 97 kDa, também da fase adulta; um antígeno vacinal associado a irradiação (IrV-5), uma proteína de 62 kDa de músculo encontrado em todas as fases; a triose-fosfato isomerase (TPI), uma enzima metabólica de 28 kDa presente também em todas as fases; a proteína Sm23, um antígeno de membrana de 23 kDa, presente em todas as fases; a proteína ligadora aos ácidos graxos (Sm14), um antígeno de 14 kDa presente no esquistossômulo e no verme adulto (BERGQUIST; COLLEY, 1998).

**Tabela 1- Proteção induzida e principais características dos candidatos prioritários à vacina contra a esquistossomose**

| ANTÍGENO          | kDa | ESTÁGIOS      | FUNÇÃO                             | PROTEÇÃO (%) |         |               |
|-------------------|-----|---------------|------------------------------------|--------------|---------|---------------|
|                   |     |               |                                    | Camundongo   | Rato    | Outros        |
| Sm28 (GST)        | 28  | Todos         | Glutathiona-S-transferase          | 30 – 60      | 40 – 60 | 40 (babuíno)  |
| Sm97 paramyosin   | 97  | Adulto Sômula | Proteína do músculo                | 30           | -       | -             |
| Sm62 IrV-5 myosin | 62  | Todos         | Proteína do músculo                | 50 – 70      | 95      | 25 (babuíno)  |
| Sm28-TPI          | 28  | Todos         | Triose fosfato Isomerase           | 30 – 60      | -       | -             |
| Sm23              | 23  | Todos         | Antígeno de membrana               | 40 – 50      | -       | -             |
| Sm14              | 14  | Adulto Sômula | Proteína ligadora de ácidos graxos | 65           | -       | 100 (coelhos) |

Fonte: BERGQUIST; COLLEY, 1998

Quatro desses antígenos foram promovidos para um estágio preliminar de escalonamento de seus processos de produção com fins de produção industrial futura, porém somente duas moléculas prioritárias alcançaram um escalonamento completo e o estabelecimento de parcerias adequadas para a fase seguinte de testes clínicos: Sm28-GST, do Instituto Pasteur, Lille, França e o Sm14, da Fiocruz, Brasil. O Sm28-GST evoluiu até os estudos de fase I/II (BERGQUIST; LEONARDO; MITCHELL, 2005) e o r-Sm14 está completamente escalonado em duas plataformas de expressão (*Pichia pastoris* e em *Escherichia coli*). Obteve-se o lote Sm14/GMP (Good Manufacturing Practice), e o estudo clínico de fase I, para avaliar a segurança do preparado vacinal Sm14 contra a esquistossomose em humanos, foi finalizado no Brasil.

O Sm14 foi o único antígeno candidato vacinal para esquistossomose, selecionado pela WHO, que emergiu de um país endêmico para a doença. Consequentemente, o Brasil progrediu para a fase de escalonamento do processo de produção em maior escala desse antígeno com a demonstração clara de significativa proteção experimental em diferentes modelos animais (ALMEIDA et al., 2003; TENDLER et al., 1996; TIMANOVA-ATANASOVA et al., 2003).

A partir da publicação destes resultados, diversos grupos de pesquisa passaram a referir a identificação de proteínas da mesma família e homólogas ao Sm14 em vários outros

helminthos de importância em medicina humana e veterinária, como a *Fasciola hepatica* causadora da fasciolose, principal doença parasitária do gado que causa perdas anuais globais de três bilhões de dólares (RODRIGUEZ-PEREZ et al., 1992) como consequência da infecção de rebanhos de bovinos, ovinos e caprinos a nível mundial. A partir das evidências experimentais de que a Sm14 era capaz de induzir proteção também contra a infecção pela *F. hepatica*, passou-se a desenvolver uma vacina bivalente (TENDLER et al., 1996).

A vertente veterinária permitiu um avanço importante no escalonamento e formulação da Sm14 com o melhoramento por mutação sítio dirigida para a obtenção de uma preparação do Sm14 mais estável. O resultado dessa preparação da Sm14 foi utilizado com sucesso também na vacinação de ovinos contra a infecção pela *F. hepatica*, consolidando a fase de testes pré-clínicos para vacina humana (ALMEIDA et al., 2003).

Nos últimos 10 anos, foi usado com sucesso nos protocolos experimentais o adjuvante RIBI composto por MPL (Monophosphoril Lipid A) + TDM (Trehalose Dicorynomycolate) que não está mais disponível no mercado. Ao longo do desenvolvimento do antígeno recombinante Sm14, foram realizados numerosos experimentos de proteção em camundongos usando diferentes formulações do antígeno com os adjuvantes Alúmen e RIBI (MPL/TDM) aprovados para uso em humanos (VILAR, 2000; VILAR et al., 2003). Os resultados obtidos confirmaram que tanto o Sm14 com Alúmen ou com RIBI (MPL/TDM) ou com ambos os adjuvantes numa mesma formulação, mantiveram os níveis de proteção que vêm sendo obtidos ao longo do desenvolvimento do estudo. Porém, após a substituição do produto comercial RIBI, produzido pela Corixa inc., comercializado pela Sigma – Aldrich, houve orientação pela OMS para procurar o Infectious Diseases Research Institute (IDRI), instituição não governamental que tem como missão dar suporte ao desenvolvimento de vacinas prioritárias para doenças negligenciadas como a esquistossomose e herdeira da empresa produtora Corixa, detentora da tecnologia genérica sobre a família de adjuvantes baseada no lipideo A (INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE, 2011).

O IDRI passou a colaborar com o projeto Sm14 como fornecedor do adjuvante Lipideo A Sintético (denominado GLA) produzindo o lote do adjuvante Lipideo A Sintético-Emulsão Estável (GLA-SE) em condições GMP, equivalente ao MPL (utilizado em toda a fase experimental do desenvolvimento da vacina baseada na Sm14), para a formulação da vacina humana (TENDLER; SIMPSON, 2008).

Em função da alteração no adjuvante, durante o desenvolvimento do antígeno vacinal, complementarmente aos dados pré-clínicos, foi necessária a realização de um teste toxicológico, objetivo dessa dissertação.

O adjuvante GLA tem estrutura semelhante ao MPL, principal componente do adjuvante RIBI (COLER et al., 2011). O GLA e o MPL têm o mesmo mecanismo de ação, interagindo com o receptor Toll Like Receptor – 4 (TLR-4) (PERSING, 2002).

A avaliação da atividade e da potência relativa do adjuvante Glucopyranosyl Lipid A (GLA) foi feita pelo IDRI através de experimentos comparativos com o adjuvante Monophosphoryl Lipid A (MPL), com o objetivo de se medir a capacidade do GLA de estimular a produção de citocinas em cultura de macrófagos (humanos e de camundongos), células dendríticas (humanas e de camundongos), monócitos do sangue periférico (humanos) e sangue total (macacos). A partir dos resultados dos experimentos pôde-se concluir que o adjuvante GLA estimula e direciona as respostas imunes inata e adaptativa ao induzir a maturação de células dendríticas e a liberação concomitante de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas associadas às células imunes. A estimulação e o direcionamento das respostas imune inata e adaptativa também resultam do aumento da imunogenicidade de antígenos recombinantes quando co-administrados com o adjuvante GLA, através da melhoria da capacidade de indução de respostas Th1, propriedades que têm implicações importantes para o desenvolvimento de adjuvantes para futuras vacinas (COLER et al., 2011).

Foram realizados estudos para avaliar a resposta imune induzida pela imunização com a proteína Sm14 formulada com o GLA-SE e em paralelo, está sendo desenvolvida uma ferramenta para ser utilizada como marcador de proteção, capaz de monitorar a imunidade protetora induzida pela vacinação. Usando técnicas de biologia estrutural e bioinformática, foram selecionadas seqüências da proteína Sm14 que correspondem a epítomos estruturais da mesma. Foram desenhados três genes sintéticos contendo as seqüências dos peptídeos protetores pré-selecionados (1.1, 1.4 e 2.1) da proteína Sm14 que mostraram proteção contra *S. mansoni* e *F. hepatica* (VILAR et al., 2003). Esse estudo apresenta uma interessante e importante oportunidade de investigação diagnóstica e de marcador de proteção, o que será feito no projeto Sm14 para o desenvolvimento da vacina contra a esquistossomose.

#### 1.4 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS REALIZADOS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DA VACINA CONTRA ESQUISTOSSOMOSE: SM14

No modelo murino, foram realizados exaustivos estudos utilizando o extrato solúvel de vermes adultos de *S. mansoni* (SE) que além da eficácia da sua atividade protetora foi identificada a importância e a influência do modelo animal nos estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina eficaz (TENDLER et al., 1992; VILAR, 1996). Foi

demonstrado através de estudos no modelo murino não singênico, que o intervalo de tempo entre a imunização e a infecção desafio é um dos parâmetros relativos a fatores que influenciam a proteção. Ênfase foi dada ao estudo da cinética, imunidade protetora e otimização dos protocolos de vacinação (TENDLER et al., 1985; 1992). Através desses estudos foi possível demonstrar quais as variáveis de protocolo de vacinação podem influenciar na indução da proteção. Os parâmetros foram avaliados através da consolidação de distintos protocolos experimentais, focados principalmente em: modelo animal; via de infecção; magnitude do inóculo cercariano; intervalo de tempo entre a imunização e infecção desafio; dose do imunógeno; uso de adjuvante e número de infecções desafios (TENDLER et al., 1991a, 1991b).

Os resultados obtidos indicaram que no modelo murino não singênico, embora sem influenciar no grau de proteção, a via de infecção tem importância quando o intervalo de tempo entre a imunização e o desafio variam. Ficou estabelecido também que a imunização com SE induz graus semelhantes de proteção frente a desafios cercarianos, independente da via de inoculação (TENDLER et al., 1991b).

Todo o desenvolvimento experimental de vacinação com o extrato SE serviu de sólida base experimental para o estabelecimento de protocolos de vacinação e modelos animais para estudo da vacinação contra a esquistossomose em escala de laboratório (TENDLER et al., 1991b).

Considerando que a vacinação é um instrumento da medicina coletiva e que efetivamente a atividade protetora induzida é regulamentada por parametria populacional, decidiu-se verificar a possibilidade de avaliar a proteção tomando por base a situação dinâmica “coletiva” e não valores médios isoladamente. Foi então desenvolvida uma metodologia inovadora empregada para avaliação da proteção com base na distribuição da frequência de cargas parasitárias de vermes adultos, nas faixas entre 0-10, 11-20, 21-30, 31-40 e > 41 vermes/camundongos, processada simultânea e comparativamente entre os grupos de animais vacinados e controles não vacinados, submetidos ao desafio simultâneo com cercárias do *S. mansoni*. (TENDLER et al., 1985, 1986, 1991a, 1991b).

Este se mostrou um método útil na avaliação do desempenho de antígenos candidatos à vacina experimental em comparação com o método clássico de avaliação de proteção. Mais tarde se viu que entre os antígenos testados em ensaios de proteção que apresentaram valores de proteção semelhantes entre si, o antígeno Sm14 foi o único a reproduzir o mesmo padrão de distribuição de carga parasitária que o SE com inversão do perfil populacional de distribuição de carga parasitária, verificou-se que 72,1% dos camundongos vacinados com SE

apresentaram carga parasitária de vermes adultos na faixa entre 0-10 (TENDLER et al., 1991b).

Isso indica que além da eficácia da sua atividade protetora foi identificada a importância e a influência do modelo animal nos estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina eficaz (TENDLER et al., 1992).

É importante ressaltar que esta metodologia permitiu evidenciar o impacto populacional da vacina, em grupos de camundongos não singênicos, utilizados em toda a fase experimental e pré-clínica. Esse estudo facilitou também a avaliação diferencial da Sm14 em relação à outros componentes da mistura e a seleção não apenas da r-Sm14 nativa, mas também para a identificação de uma forma mutante que foi construída pela mutagênese sítio dirigida, selecionada por sua estabilidade mais elevada se comparada à seqüência da proteína nativa (RAMOS et al., 2009).

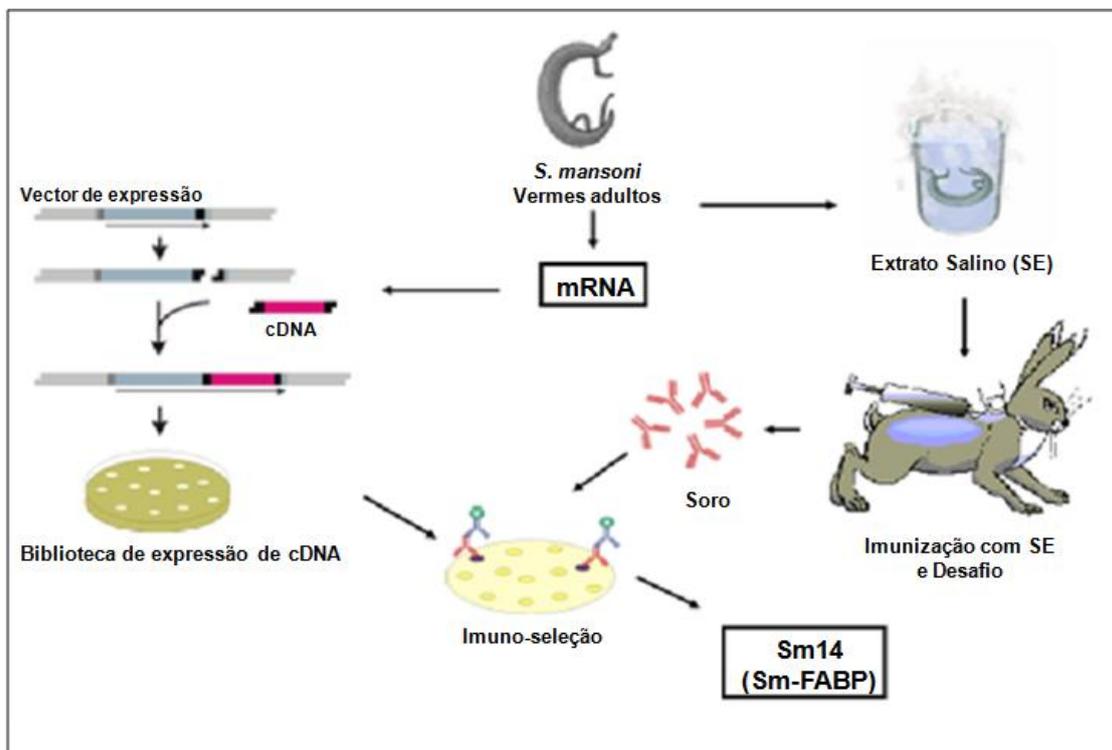
No modelo coelho Nova Zelândia foi possível estabelecer um padrão confiável e reprodutível de infecção cercariana percutânea, com recuperação de cargas parasitárias adultas homogêneas, considerando o número, tamanho dos parasitas e proporção macho/fêmea, por períodos prolongados pós-infecção (TENDLER et al., 1985). Foi demonstrado que na associação entre coelho e o *S. mansoni* ocorre uma resposta peculiar á reinfecção, sugerida como um novo modelo de imunidade na esquistossomose (ALMEIDA et al., 1989). Ensaios de vacinação utilizando o SE em Adjuvante Completo de Freund (ACF) seguindo o protocolo básico desenvolvido para camundongos resultaram em altos níveis de proteção de 76 a 99% em coelhos (TENDLER et al., 1991b). Soro de coelhos com proteção próxima a 100%, ou seja, aqueles que após a vacinação com SE ficaram totalmente protegidos contra a infecção pelo *S. mansoni*, foram denominados soros de alta proteção (*High*), enquanto que os soros de animais com níveis intermediários de proteção foram denominados de baixa proteção (*Low*). Estes soros foram utilizados na seleção de componentes antigênicos responsáveis pela proteção determinada pelo SE (TENDLER et al., 1991a).

#### 1.4.1 Identificação da proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*

A molécula r-Sm14 foi selecionada a partir do extrato salino (SE) que conferia proteção contra a esquistossomose em camundongos e coelhos (SCAPIN et al., 1980; TENDLER et al., 1982, 1986). Ela foi identificada com base numa investigação de longo prazo enfocando os experimentos de vacinação em dois modelos de animais distintos (camundongos “swiss” e coelhos Nova Zelândia) (TENDLER et al., 1991a, 1991b).

A transição do extrato SE, para o antígeno purificado Sm14 foi realizada a partir da identificação dos constituintes do extrato salino utilizando anti-soro na seleção de clones de biblioteca de expressão de cDNA a partir de mRNA de vermes adultos *S. mansoni*, usando como vetor o fago  $\lambda$ gt11. Foi utilizada a técnica de imuno-seleção (immunoscreening), por duplo filtro, para evidenciar os clones que expressavam os antígenos que reagiam mais fortemente, tanto contra os soros de alta proteção (High), quanto para o de baixa proteção (Low). Vários clones foram isolados, quando utilizados ambos os soros (*High* e *Low*), entre eles antígenos já conhecidos como Sm28 (BALLOUL et al., 1987b) e paramiosina (PEARCE et al., 1986, 1988). Porém, somente quando utilizado os soros de coelhos, que após a vacinação com SE ficaram totalmente protegidos contra a infecção pelo *S. mansoni*, foi evidenciada a presença de um clone que não foi identificado quando utilizado o soro de baixa proteção (Figura 4). Segundo Moser e colaboradores (1991), o seqüenciamento dos clones com forte sinal ajudou a identificar uma proteína com massa molecular teórica de 14 kDa, que foi denominada Sm14 (*Sm* de *Schistosoma mansoni*, e 14, de sua massa molecular de 14 kDa). A sequência de aminoácidos demonstrou uma significativa homologia com a família de proteínas que se ligam a ácidos graxos (fatty acid-binding proteins, FABP), indicando um possível papel fisiológico desta proteína, como carreadora de lipídeos.

**Figura 4 - Processo de identificação do antígeno Sm14**

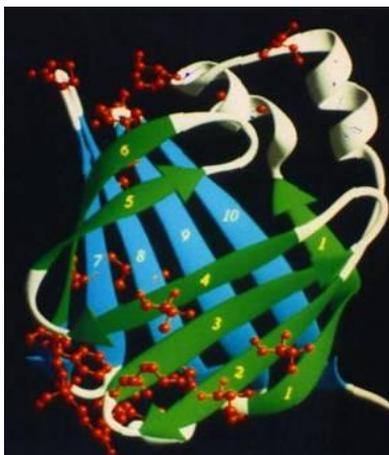


## 1.5 MODELAGEM MOLECULAR

A estrutura tridimensional característica da família das FABPs é constituída por uma forma chamada de barril- $\beta$ , que consiste em dez folhetos  $\beta$  pregueados anti-paralelos e duas  $\alpha$ -hélices formando uma região de “dobradiça” que estaria localizada na “boca” do barril (Figura 5). As alças formadas entre as fitas  $\beta$  pregueadas são regiões que tem maior flexibilidade e variabilidade. Essas alças têm sido propostas como possíveis epítomos responsáveis pela antigenicidade da molécula, graças a sua exposição na parte mais externa da molécula, o que poderia facilitar seu acesso aos componentes do sistema imunológico (MOSER et al., 1991; TENDLER et al., 1996).

A estrutura cristalográfica do Sm14, propriamente dita, foi obtida por Angelucci et al., 2004, confirmando a modelagem molecular obtida anteriormente utilizando como molde as FABP de músculo humano, adipócito de camundongo e intestino de rato obtidas do banco de dados do Brookhaven Protein Data Bank, PDB, (código de acesso 2 HMB, 1ALB e 2IFB respectivamente) (TENDLER et al., 1996). A modelagem da proteína também foi construída utilizando como molde a estrutura da B-FABP de cérebro humano (PDB 1FE3) pelos estudos de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) realizados por Ramos e colaboradores (2009).

**Figura 5 - Modelagem Molecular da proteína Sm14**



Fonte: (TENDLER et al., 1996)

É importante ressaltar que comparando as estruturas da Sm14-M20 (ANGELUCCI et al., 2004) e Sm14-M20V62 (RAMOS et al., 2009) e o modelo estrutural original (TENDLER et al., 1996) observou-se que não existem diferenças estruturais significativas. Esses dados associados ao conjunto anterior de informações sobre a proteína Sm14, tais como: atividade imuno-protetora, atividade bioquímica, imuno-localização, caracterização do polimorfismo,

caracterização do gene codificador da Sm14, entre outros, tornaram a proteína Sm14 o antígeno melhor caracterizado de *S. mansoni* (BRITO et al., 2000a, 2000b; MOSER et al., 1991; RAMOS, 2002; RAMOS et al., 2001, 2003; THAUMATURGO, 2002).

## 1.6 A HISTÓRIA DO ANTÍGENO SM14 COMO UM CANDIDATO A VACINA ANTI-HELMÍNTICA

Os esquistossomas estão impossibilitados de sintetizar *de novo* a maioria de seus lipídeos em particular os ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (SAMUELSON et al., 1980). Desta forma, o parasita fica completamente dependente de seu hospedeiro para estes e outros suprimentos de lipídeos. As FABPs podem ser particularmente importantes para a ingestão, transporte e compartimentalização dos ácidos graxos derivados do hospedeiro e são consideradas uma molécula alvo interessante para o desenvolvimento de vacina anti-helmíntica. A Sm14 foi o primeiro homólogo da família das FABPs identificado nos helmintos (MOSER et al., 1991). Posteriormente, membros da mesma família, apresentando elevada homologia em nível de proteína, foram identificados em várias espécies de helmintos (Quadro 1).

**Quadro 1 - Lista de FABPs de parasitas depositadas no banco de dados UNIPROT**

| Número do acesso | Nome do acesso | Organismo                      |
|------------------|----------------|--------------------------------|
| Q8MU93           | Q8MU93_ANCCA   | <i>Ancylostoma caninum</i>     |
| Q8MUA9           | Q8MUA9_ANCCA   | <i>Ancylostoma caninum</i>     |
| P55776           | FABH_ASCSU     | <i>Ascaris suum</i>            |
| A8QF29           | A8QF29_BRUMA   | <i>Brugia malayi</i>           |
| Q9GU91           | Q9GU91_BRUMA   | <i>Brugia malayi</i>           |
| Q20223           | FABP1_CAEEL    | <i>Caenorhabditis elegans</i>  |
| Q5Q030           | Q5Q030_ECHGR   | <i>Echinococcus granulosus</i> |
| Q02970           | FABP1_ECHGR    | <i>Echinococcus granulosus</i> |
| Q9BMK3           | FABP2_ECHGR    | <i>Echinococcus granulosus</i> |
| Q94567           | Q94567_FASGI   | <i>Fasciola gigantica</i>      |
| Q9UAS2           | FABP1_FASGI    | <i>Fasciola gigantica</i>      |
| Q7M4G0           | FABP1_FASHE    | <i>Fasciola hepatica</i>       |
| Q9U1G6           | FABP3_FASHE    | <i>Fasciola hepatica</i>       |
| P41496           | FABPM_SCHGR    | <i>Schistocerca gregaria</i>   |
| Q6IX07           | Q6IX07_SCHBO   | <i>Schistosoma bovis</i>       |
| A5A6F5           | A5A6F5_SCHHA   | <i>Schistosoma haematobium</i> |
| O45035           | FABP_SCHJA     | <i>Schistosoma japonicum</i>   |
| P29498           | FABP_SCHMA     | <i>Schistosoma mansoni</i>     |

Fonte: (www.uniprot.org)

A reatividade imunológica cruzada entre a Sm14 e as diferentes espécies de trematodos, nematodos e cestodos foi demonstrada, assim como, a proteção imunológica cruzada contra a infecção pela *F. hepatica* em camundongos (TENDLER et al., 1996) e ovelhas (ALMEIDA et al., 2003).

Estudos sobre a resposta imune induzida pelo r-Sm14 foram exaustivamente realizados por grupos brasileiros (BRITO et al., 2000a, 2000b; FONSECA et al., 2004a, 2004b, 2005, 2006) e pelo grupo do Maged Al Sherbiny no Egito (AL-SHERBINY et al., 2003). Todos esses estudos, afirmam que o r-Sm14 é capaz de induzir uma resposta imune celular do tipo Th1. Foi realizado por Brito e colaboradores (2000a) um estudo da imunidade celular em três grupos de pacientes caracterizados como: Endêmico Normal (indivíduos que residem em área endêmica, porém são naturalmente resistentes); pacientes de fase crônica (forma intestinal ou hepatoesplênica), previamente tratados e curados não residentes em áreas endêmicas e pacientes saudáveis, utilizados no estudo como controle negativo. Neste trabalho, mostrou-se uma correlação direta entre a resistência à doença e a resposta celular contra a proteína Sm14. Foi determinada a função imunoreguladora da interleucina 10 (IL-10), interferon  $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelos PBMC na proliferação de células T e produção de citocinas. Os resultados sugerem uma resposta imune mediada por células Th1 associada à resistência

natural a infecção nos indivíduos residentes nas zonas endêmicas (EN) e confirmam a citocina IL-10 como uma importante molécula regulatória modulando a resposta imune Th1 na esquistossomose crônica. Estes resultados dão maior suporte para a importância da proteína Sm14 como potencial candidato vacinal contra a esquistossomose humana.

Estudos realizados por esses mesmos grupos mostram que a resposta imune humoral predominante nos grupos endêmico normal (EN) e resistentes é IgG1 e IgG3. Esse é um importante achado para o desenvolvimento da vacina desde que essas subclasses de anticorpos sejam associadas com a morte parasitária (AL-SHERBINY et al., 2003; BRITO et al., 2000b).

#### 1.6.1 A proteína Sm14 como vacina anti-helmíntica bivalente contra esquistossomose e fasciolose

Sendo o Sm14 representativo de um novo antígeno de *S. mansoni*, cuja capacidade protetora ainda não havia sido avaliada, experimentos de proteção foram executados usando o gene de Sm14 expresso como uma proteína de fusão com  $\beta$ -galactosidase, no vetor  $\lambda$ gt11, preparado diretamente do clone de cDNA da biblioteca original.

Numa etapa seguinte, o cDNA da proteína Sm14 foi subclonado no vetor pGEMEX-1 (Promega). A construção obtida, pGEMEX-Sm14, expressou a proteína Sm14 como uma fusão com o produto do gene 10 do bacteriófago T7 (*major T7 capsid protein*), resultando numa proteína quimérica de aproximadamente 45 KDa. Essa proteína de fusão relativamente grande apresentou suficiente estabilidade e níveis de expressão que permitiram a realização dos primeiros ensaios de vacinação em camundongos “swiss”. No caso da expressão no pGEMEX a proteína de fusão foi expressa em forma de corpúsculos de inclusão, o que facilitou sua purificação, mediante géis preparativos de SDS-PAGE. Esta proteína de fusão conferiu cerca de 50% de proteção contra infecção por cercárias de *S. mansoni* em animais de experimentação, semelhante ao nível de proteção alcançado pelo extrato salino (SE) destes vermes, usado como controle positivo. Por outro lado esta mesma proteína recombinante conferiu 100% de proteção contra a infecção por metacercárias de *Fasciola hepatica* (TENDLER et al., 1995, 1996), mostrando que a proteína Sm14 poderia ser usada como vacina anti-helmíntica.

A metodologia de purificação da proteína expressa com o vetor pGEMEX-Sm14, utilizada nesta etapa do projeto não era adequada para produção da proteína em escala maior. Para o escalonamento do processo de produção da Sm14 em maior escala, foi necessário o

uso de procedimentos cromatográficos apropriados. Inicialmente foi utilizada a Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC - Crowe et al., 1994). Com esse fim, a seqüência codificadora (ORF – Open Reading Frame) da proteína Sm14 foi subclonada inicialmente no vetor de expressão pRSETA (Invitrogen), que expressa a proteína recombinante em fusão com a seqüência N-terminal de 6 histidinas, um epítopo do fago T7 (T7 tag) reconhecido por um anticorpo monoclonal comercial, seguido por um sítio de clivagem para a enzima enteroquinase que permite separar a proteína de interesse do parceiro de fusão após a purificação por IMAC.

As etapas seguintes do escalonamento da proteína Sm14 recombinante, que abrangem desde a construção de vetores de expressão (pAE - um vetor construído tomando como base o pRSETA-6xHis-Sm14 - RAMOS et al., 2001, 2004), e obtenção de uma proteína mais estável, através da identificação de uma forma mutante construída por mutagênese sítio dirigida (M20V62) até o desenvolvimento do processo de purificação seguido da avaliação da atividade protetora das formas purificadas, conforme estão descritas nos trabalhos de Ramos e colaboradores (2001, 2003 e 2009) e Tendler (2009).

As mudanças efetuadas durante o desenvolvimento da vacina com o antígeno Sm14, como a melhora da estabilidade da proteína através das modificações introduzidas nos sistemas de expressão e purificação, foram monitoradas através de experimentos controlados. Como se mostrou no caso da proteína produzida em *Pichia pastoris*, esses controles ajudam a verificar se o produto final dos novos protocolos é semelhante à proteína testada originalmente como protetora.

Os resultados obtidos até essa etapa do projeto deram subsídios para iniciar o escalonamento do processo final de produção da proteína Sm14 em maior escala, com a demonstração clara de significativa proteção experimental em diferentes modelos animais, reproduzida de forma independente em vários laboratórios, além do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE)/IOC/Fiocruz, onde foi desenvolvido originalmente (BRITO, et al., 2000a, 2000b; FONSECA, et al., 2004a, 2004b; GARCIA, et al., 2008; LÓPEZ-ABÁN et al., 2007, 2008; NAMBI, et al., 2005; TIMANOVA-ATANASOVA, et al., 2003).

## 1.7 PERSPECTIVAS PARA COMERCIALIZAÇÃO: UMA REDE DE PARCERIA PÚBLICO/PRIVADA

A Sm14 recombinante é atualmente a base molecular de uma vacina antiparasitária que está sendo desenvolvida como uma vacina anti-helmíntica bivalente, ou seja, direcionada tanto contra a fasciolose como a esquistossomose. Existem cinco famílias de patentes para a Sm14 recombinante e peptídeos sintéticos derivados da mesma proteína, requeridas e parcialmente concedidas em todos os países onde as parasitoses humana e veterinária, esquistossomose e fasciolose respectivamente são importantes, de modo a garantir as condições de proteção intelectual e industrial para o desenvolvimento dos produtos finais, com o objetivo de permitir que avanços científicos alcancem o mercado global (TENDLER; SIMPSON, 2008).

A Fiocruz e o Laboratório de Esquistossomose Experimental estabeleceram parcerias e licenciamentos das patentes para a Sm14 com o objetivo claro de encontrar mecanismos que permitissem a efetiva consecução dos objetivos e metas propostas para as etapas e eixos do projeto em desenvolvimento. O mais importante foi o licenciamento das patentes para a empresa Alvos Consultoria, Desenvolvimento e Comercialização de Produtos Biotecnológicos S.A., que é constituída pela Fundação BIOMINAS e a FIRCAPITAL, para dinamizar o projeto e apoiar o desenvolvimento integral dessa tecnologia nas aplicações dos produtos veterinário e humano, no caso da vacina contra a esquistossomose. No contexto do acordo de cooperação estabelecido inicialmente para a vacina veterinária (fasciolose) em 2005 e posteriormente para a vacina humana (esquistossomose), foi possível responder à chamada pública da Empresa Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) para o financiamento de projetos em desenvolvimento nas áreas temáticas selecionadas e no contexto de uma parceria Público-Privada.

A partir de então o Projeto Sm14 passou a ser desenvolvido no contexto dos três grupos de objetivos propostos para o financiamento FIOCRUZ/FINEP/ALVOS para a vacina humana: 1 - Escalonamento final do processo de produção do Sm14 e produção dos lotes em GMP para os testes clínicos; 2- Formulação do Sm14 com os adjuvantes apropriados e realização dos testes clínicos fase I no Brasil; 3- Desenvolvimento de teste marcador de proteção para monitoramento da vacinação e resistência induzida, utilizando as seqüências de peptídeos pré-selecionadas.

No desenho deste projeto, foram então definidas as parcerias e premissas da rede de colaboradores, que passou a atuar de forma integrada. Destaque para Instituto Ludwig de

Pesquisas sobre o Câncer, NY, USA /Cornell University, que foi contratado para produzir em condições GMP o lote vacinal do r-Sm14 para a realização dos testes clínicos fase 1 e 2 e o Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas (Infectious Diseases Research Institute - IDRI), Seattle, EUA, que passou a colaborar com o projeto Sm14 tanto para vacina humana quanto veterinária, como fornecedor do adjuvante Lipideo A sintético produzido em condições GMP para a formulação das vacinas.

Todos os resultados do desenvolvimento da vacina contra esquistossomose: Sm14 foram registrados na Brochura do Investigador (TENDLER, 2009), submetidos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e aprovados em 2010. O teste clínico fase 1 em humanos, para avaliar a segurança do antígeno Sm14, teve início em maio de 2011, logo após a aprovação do protocolo clínico de pesquisa pela ANVISA e está sendo conduzido pela equipe do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC), situado dentro do campus de Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz no Rio de Janeiro.

A Ourofino Agronegócio, empresa do setor veterinário 100% nacional, tornou-se parceira da Fiocruz, em 2010, através da aquisição da ALVOS S.A., que era detentora do licenciamento das patentes. Atualmente esta parceria possibilita a Ourofino acesso a tecnologia de ponta resultante da pesquisa realizada pelo LEE/IOC, podendo produzir e comercializar vacinas recombinantes, contra enfermidades veterinária e humana. Esta parceria ocorre no âmbito do complexo econômico e industrial da saúde, onde o resultado do conhecimento gerado na Fiocruz (e protegido por patentes) será desdobrado na concretização da produção destas vacinas inovadoras que irão atender às necessidades de saúde da população brasileira e mundial.

## 1.8 CONDUÇÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA PARA VACINAS

O processo de pesquisa e desenvolvimento é fundamental para a obtenção de novos produtos seguros e eficazes. Isso traz à Vigilância Sanitária uma responsabilidade significativa no controle desse processo já que a ela compete a eliminação, diminuição ou prevenção de riscos à saúde (BRASIL, 1990). Além do fator risco, as noções de qualidade, eficácia e segurança constituem categorias operacionais nas ações de proteção à saúde (COSTA, 2003).

Com a finalidade de regular o uso de novos medicamentos, vacinas ou testes diagnósticos por seres humanos, os diferentes países estabeleceram critérios mínimos de segurança para a liberação de novas formulações no mercado. As agências reguladoras, como

a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) na Europa, são responsáveis pela elaboração de normas técnicas e pela avaliação das novas solicitações de uso específico, pela fiscalização e acompanhamento do uso destas formulações dentro de suas indicações (GOLDIM, 2007).

Para realização de pesquisa com novos produtos, torna-se necessário o atendimento às normas vigentes para este fim. Somente após avaliação e aprovação da ANVISA, através de um dossiê, contendo a compilação dos dados clínicos e não clínicos sobre o produto que está sob investigação e mostrando a relevância para o seu estudo em seres humanos, a pesquisa clínica com novos fármacos, medicamentos, vacinas ou testes diagnósticos, poderão ser realizados. (BRASIL, 2004a).

As etapas de pesquisas com novas formulações são coordenadas e estabelecidas por diferentes documentos e diretrizes. No Brasil estas etapas foram estabelecidas seguindo as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde CNS 01/88 (BRASIL, 1988) e 251/97 (aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos - BRASIL, 1997), assim como as Boas Práticas de Pesquisa Clínica por meio da Resolução 129/96 (MERCOSUL, 1996).

De acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 251/97, os estudos pré-clínicos também denominados de estudos de fase 0, por antecederem as fases clínicas, que envolvem seres humanos, devem gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos. Os relatos dos estudos experimentais devem especificar o método utilizado, os modelos celulares, teciduais ou animais utilizados, os testes laboratoriais, os dados de farmacodinâmica, farmacocinética e toxicologia. Os resultados pré-clínicos devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso (BRASIL, 1997).

Para que os estudos de segurança em animais possam trazer informações mais consistentes é importante que os mesmos sejam realizados em modelos adequados. Para a escolha dos modelos deve-se ter conhecimento prévio das similaridades e diferenças entre o perfil farmacocinético no animal e no homem.

Outros fatores que devem ser considerados na escolha do modelo animal são: a facilidade da reprodução ou aquisição da espécie, o tempo de crescimento/desenvolvimento e a facilidade de manuseio em condições experimentais. Baseado nesses fatores tem sido comum a utilização de ratos e coelhos em investigações de segurança (WHO, 2003).

Para garantir a qualidade na condução desses estudos, é importante que eles sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL). Há guias específicos sobre esse tema, oriundos de agências reguladoras (como FDA) e outras instituições como a *World Health Organization* (WHO). Para tanto, além de outros cuidados citados nas Boas Práticas de Laboratório, os animais selecionados devem ser saudáveis, de preferência livres de patógenos (SPF – *Specific Pathogen Free*), de origem conhecida, possuir peso e idade adequados, não sofrerem estresse, estarem convenientemente aclimatizados no ambiente experimental antes da realização do estudo (WHO, 2003).

Esse trabalho restringiu-se ao estágio da etapa pré-clínica relacionado à toxicologia. Avaliou-se, por meio de estudo de toxicidade de doses repetitivas, a segurança do antígeno recombinante Sm14 formulado com GLA-SE (Glucopyranosyl Lipid A) quando administrados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) subcutaneamente. Os resultados foram pré-requisitos para os estudos de Fase I da vacina contra a esquistossomose.

## 2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose representa a miséria das doenças chamadas negligenciadas, por significar um obstáculo ao desenvolvimento econômico em grande parte do terceiro mundo, apresentando uma ameaça que é atualmente abordada em tentativas de controle somente através de re-tratamentos quimioterápicos regulares e contínuos.

Nesse cenário, a abordagem simplista do tratamento exclusivamente com medicamentos pode não ser suficiente e, na pior das hipóteses, pode até exacerbar a doença. Para enfrentar esse desafio, a inserção de vacinas no contexto do controle total da esquistossomose através do uso combinado de quimioterapia e vacinação é o caminho recomendado pela WHO como base para uma abordagem nova e efetiva de controle (BERGQUIST et al., 2005).

A presente dissertação foi realizada visando contribuir com o desenvolvimento da vacina humana contra a esquistossomose, na medida em que aspectos relacionados à segurança do antígeno vacinal foram avaliados. Trata-se de um novo produto destinado à melhoria da qualidade de vida humana e se insere perfeitamente no contexto da promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças humanas, bem como na tecnologia de controle de qualidade de produtos preconizadas pelo INCQS/FIOCRUZ.

Com a finalização do desenvolvimento do produto, fruto exclusivo de tecnologia de ponta gerada em instituições brasileiras, com proteção intelectual sólida, de propriedade da Fiocruz com suporte de empresas nacionais de fomento à pesquisa e tecnologia e da realização dos estudos clínicos em seres humanos, será possível disponibilizar para a sociedade um produto relevante para a prevenção e controle da transmissão de uma grande endemia parasitária. A vacina proporcionará uma menor relação custo-benefício para o controle da doença ao promover proteção em longo prazo, e uma melhor qualidade de vida à população ao prevenir sucessivas infecções e reduzir a morbidade e a mortalidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança do antígeno recombinante Sm14 e do adjuvante LIPID A (GLA) quando administrados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) subcutaneamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o surgimento de sinais gerais de toxicidade e letalidade;
  
- Investigar uma possível atividade tóxica através da observação dos parâmetros comportamentais e variação da evolução ponderal;
  
- Realizar uma investigação toxicológica por meio de análises bioquímicas e hematológicas;
  
- Avaliar possíveis alterações ponderais e histopatológicas de órgãos vitais;
  
- Avaliar histologicamente a possibilidade de efeitos adversos no local da injeção provocados pela administração do antígeno vacinal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com protocolo fornecido pelo *Infectious Disease Research Institute* (IDRI), este desenvolvido por BAS Evansville & Corixa Corporation (nº 716A-301-930-02; 2002), segundo as recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA, EUA).

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos da raça Nova Zelândia, convencionais, 12 machos e 12 fêmeas com aproximadamente 16 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os coelhos apresentavam um peso inicial entre 3,0 e 4,0 kg e as fêmeas eram nulíparas e não gestantes. Os animais foram alojados nos Biotérios de Experimentação Animal do Pavilhão Cardoso Fontes e Pavilhão Lauro Travassos, sendo 6 machos e 6 fêmeas distribuídos em cada um dos Biotérios. Todos os animais foram acomodados em estantes ventiladas, de acordo com as boas práticas de manutenção de animais e laboratório e comissão de ética.

As estantes apresentam um ambiente coletivo, com termômetro digital para leitura interna e um controlador de uso dos filtros de ar. Cada estante ventilada continha seis gaiolas de aço inoxidável (45 x 60 x 40 cm) e cada gaiola abrigou um coelho, cuja distribuição foi feita de forma aleatória.

Para limpeza das gaiolas, as bandejas situadas na parte inferior das mesmas, contendo maravalha e excrementos, eram retiradas e substituídas duas vezes por semana por outras previamente limpas contendo maravalha autoclavada. Os animais foram aclimatados durante os 20 dias que antecederam o início do experimento.

A escolha do coelho como modelo animal utilizado no estudo pré-clínico toxicológico se deve, ao fato deste animal ser um modelo consagrado para uso em testes toxicológicos de produtos para uso humano e ao seu comportamento frente à vacinação experimental contra esquistossomose, alvo de estudo na fase inicial de desenvolvimento do projeto da vacina contra a doença (ALMEIDA et al., 1987, 1989; TENDLER et al., 1991a, 1996).

Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa de Animais da Fiocruz (Licença: L-0063/08) (CEUA/Fiocruz).

#### 4.1.1 Alimentação

Os animais recebiam água e ração comercial para coelhos (CRIACOELHO – fabricante GUABI/lote 8080) *ad libitum*. A água era fornecida para os animais em garrafas plásticas (mamadeiras) de policarbonato na quantidade de 700mL (2 garrafas/animal). A água fornecida era previamente filtrada e substituída 3 vezes por semana. A análise microbiológica da água era realizada trimestralmente. A ração era oferecida aos animais em cocho de alumínio, sendo reabastecida totalmente durante o processo de limpeza do ambiente dos animais, realizado duas vezes por semana. Todos os animais foram mantidos sobre as seguintes condições ambientais: temperatura e umidade relativa do ar na faixa de 15 a 20°C e 30 a 70%, respectivamente, e ciclo claro-escuro constante (período claro de 6:00 às 18:00 horas).

#### 4.1.2 Identificação dos animais

Cada coelho foi identificado através de marcação (tatuagem) na orelha, com números sequenciais (Figura 6) e cada estante foi identificada através de um cartão contendo as seguintes informações: Laboratório; número do animal; pesquisador responsável; número da licença do CEUA; antígeno inoculado e data das inoculações (Figura 7).

**Figura 6 - Identificação através de tatuagem na orelha do animal**



**Figura 7 - Cartão de identificação das gaiolas**

|   |                               |                          |
|---|-------------------------------|--------------------------|
|  Ministério da Saúde<br>Fundação Oswaldo Cruz<br>Instituto Oswaldo Cruz<br>Centro de Experimentação Animal |                               | 993<br>PBS               |
| Est/Prat/Gaiola   | / /                           | Pedido 33262             |
| Lab.  | Esquistossomose Experiment Cx |                          |
| Pesq.   | Miriam Tendler                | CEUA 106.02              |
| Chegada   | 12 / 02 / 08                  | Saida / /                |
| Peso/idade  | 2 semanas                     | Linhagem Coelho N2       |
| Inoculado com   | PBS                           |                          |
| Infecção  | / /                           | nº animais 4 ( ) M (X) F |

## 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 4.2.1 Antígenos vacinais

#### 4.2.1.1 *Sm14* expresso em *Pichia pastoris*

O lote do antígeno r-Sm14 (*Pp* USA 01/07 20/01/08), desenvolvido no sistema de expressão em *P. pastoris*, em parceria com o Instituto Ludwig de Pesquisas para o Câncer - Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) e Cornell University, NY, USA. em padrão GMP, foi utilizado no estudo.

#### 4.2.1.2 *Sm14* expresso em *Escherichia coli*

O lote do antígeno r-Sm14 (Sm14-M20V62 - *Ec* Bra – 29/01/08), utilizado no estudo, foi desenvolvido no sistema de expressão de *E. coli*, e produzido no Laboratório de Esquistossomose experimental/LEE/IOC.

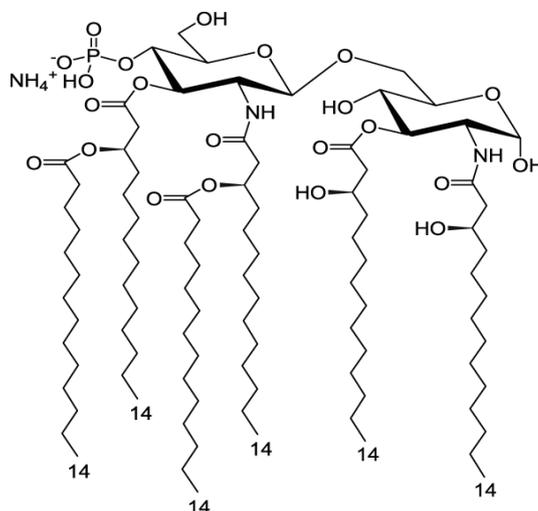
### 4.2.2 Adjuvante

O Infectious Diseases Research Institute (IDRI, USA), disponibilizou o lote do adjuvante Glucopyranosyl Lipid A (GLA) Stable Emulsion (SE) produzido em condições GMP (Good Manufacturing Practices).

O GLA tem uma estrutura semelhante ao MPL -Monophosphoril Lipid A- (presente no adjuvante RIBI, usado por muitos anos em nosso laboratório). No entanto a diferença é que

o GLA é uma molécula totalmente sintética, o que permite sua produção em escala de gramas e estabilidade em solução aquosa e em emulsão óleo em água (Figura 8).

**Figura 8 - Estrutura do adjuvante GLA**



Fonte: (COLER et al., 2011)

#### 4.2.3 Formulação do antígeno vacinal Sm14 e o adjuvante GLA-SE

As formulações das doses do antígeno vacinal foram preparadas no dia da imunização a partir das seguintes soluções estoque: Sm14*Pp* USA (0,2mg/mL, Sm14*Ec* Bra (0,2mg/mL) e GLA-SE (0,1mg/mL). Para a formulação dos antígenos vacinais (Sm14*Pp*USA e Sm14*Ec*Bra), foram misturados 400µl da proteína (0,2mg/ml) e 400µl de GLA-SE (0,1mg/ml), a concentração do antígeno e do adjuvante GLA-SE na solução final foi 0,1mg/mL e 0,05mg/mL respectivamente. Para o preparo do controle GLA-SE, foram misturados 400µl de tampão PBS (preparado no próprio LEE com água destilada estéril) e 400µl de GLA-SE (0,1mg/ml), obtendo uma concentração final do adjuvante de 0,05mg/mL. O volume do inoculo foi de 0,5ml/coelho (equivalente a 50µg de Sm14 e 25µg de GLA-SE). A dose utilizada neste estudo foi baseada nos resultados obtidos no processo de desenvolvimento da vacina contra esquistossomose no LEE/IOC, durante a fase experimental com o Sm14, quando utilizado o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal (ALMEIDA et al., 1987, 1989; TENDLER, 2009; TENDLER et al., 1991a, 1996).

### 4.3 PROTOCOLO DE VACINAÇÃO

Foram utilizados para o teste toxicológico um total de 24 coelhos, sendo 12 machos e 12 fêmeas, incluídos aleatoriamente a 04 grupos de animais, cada grupo contendo três coelhos machos e três fêmeas, sendo eles:

**Grupo A:** 3 machos e 3 fêmeas imunizados com 50µg de Sm14 *Pp* USA + 25µg GLA-SE;

**Grupo B:** 3 machos e 3 fêmeas imunizados com 50µg de Sm14 *Ec* Bra + 25 µg GLA-SE;

**Grupo C:** 3 machos e 3 fêmeas imunizados com 25µg GLA-SE;

**Grupo D:** 3 machos e 3 fêmeas imunizados com PBS (tampão salina).

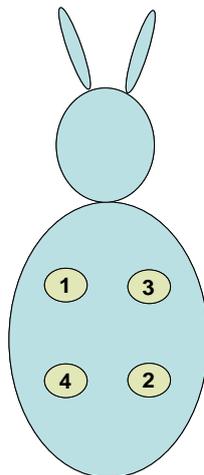
Os animais receberam quatro doses da vacina, por via subcutânea, com intervalos de 14 dias, em doses iguais (0,5 ml). O grupo controle recebeu apenas o tampão salina (PBS) e os coelhos deste grupo foram manuseados de forma idêntica aos animais dos grupos vacinados. O dia da aplicação da primeira dose foi designado como dia 0. As doses do estudo foram administradas nos dias 0, 14, 28 e 42. Um dia antes da inoculação, todos os animais foram tricotomizados, para expor a área de inoculação (área escapular até a região do quadril). Esse procedimento foi realizado, durante o curso do experimento antes de cada dose, para avaliar possíveis reações locais e quando necessário, para sinalizar o local da injeção (Figura 9). A injeção subcutânea foi administrada em diferentes sítios ao longo da linha dorsal. Os sítios foram separados um dos outros por pelo menos 5 centímetros (Figuras 10 e 11). As injeções foram administradas na região do ombro com volume de 0,5ml dos antígenos formulados com adjuvante LIPID A (GLA). A agulha utilizada para as inoculações foi a 25G 5/8.

**Figura 9 – Coelho com dorso tricotomizado**



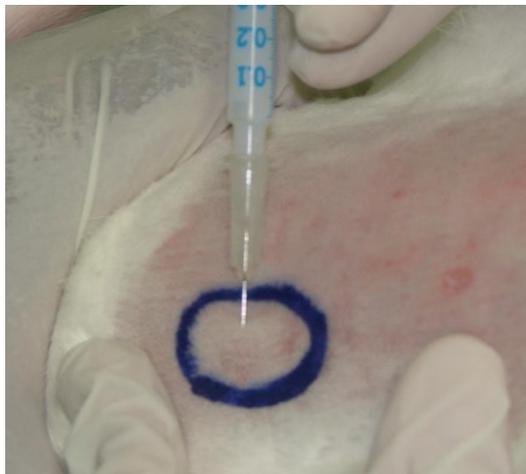
Área de inoculação exposta e com a marcação para o local da injeção

**Figura 10 - Desenho esquemático dos locais das inoculações**



Os números representam os locais onde foram aplicadas as respectivas doses

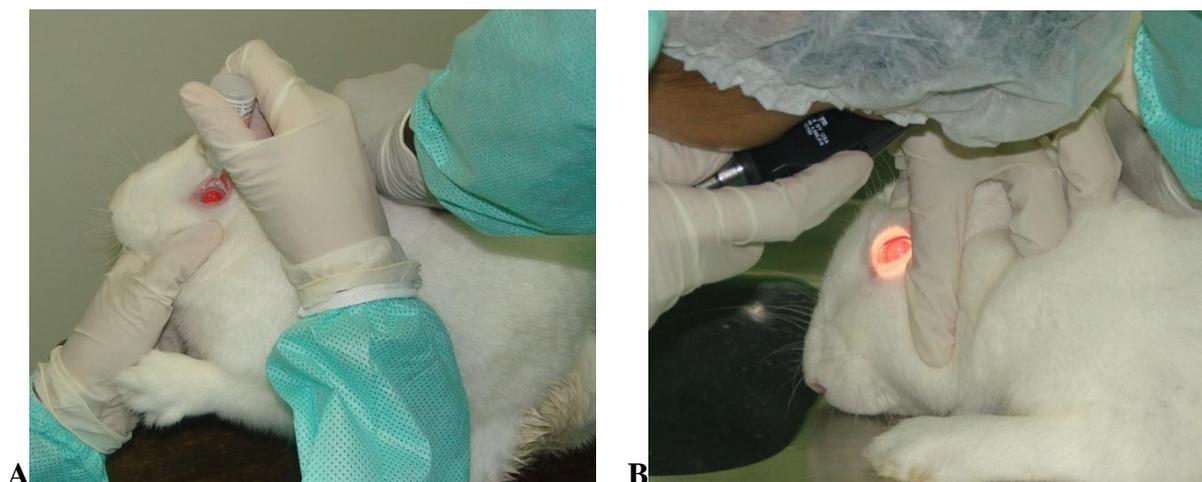
**Figura 11 – Inoculação do preparado vacinal**



#### 4.3.1 Exame oftalmoscópico

Todos os animais foram examinados para anormalidades oftálmicas por um médico veterinário qualificado, 10 dias antes da primeira dose da vacina (dia -10). Os olhos de cada animal foram dilatados com 0,5% de solução Midriática, cujo princípio ativo é a Tropicamida e apresentação: Mydriacyl<sup>®</sup> (Figura 12).

**Figura 12 – Exame oftalmológico**



Dilatação das pupilas com Mydriacyl<sup>®</sup> (A) e exame de fundo de olho (B)

#### 4.3.2 Avaliação clínica

Os animais foram observados diariamente, quanto ao nível de estresse e aspecto físico, duas vezes ao dia (manhã e tarde), durante o período de estudo (APÊNDICE A). Para a avaliação do nível de estresse foram observados aspectos como apetite (consumo de água e de alimento), agitação, agressividade, expressão facial, resposta ao manejo e perda de peso. Foram também avaliados parâmetros como mortalidade; alterações nas mucosas, pelos e pele (reações locais devido às inoculações e presença de manifestações hemorrágicas em qualquer parte do corpo); olhos; sistema nervoso autônomo (lacrimejamento, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório); locomoção e comportamento estereotipado; especial atenção para sintomas tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Todos os dados foram anotados no caderno de registro do laboratório, com observações clínicas detalhadas.

#### 4.3.3 Evolução ponderal

Todos os 24 animais foram pesados vinte dias antes do primeiro inóculo (dia -20) e posteriormente às inoculações, nos dias: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 51. A alimentação e o consumo de água foram verificados diariamente. O consumo individual de comida foi medido uma vez por semana, durante o período do estudo.

#### 4.3.4 Análises laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue da veia central da orelha dos coelhos (sob 12 horas de jejum) dos 4 grupos para exames hematológicos, de coagulação e de bioquímica sérica, no décimo dia anterior à 1<sup>a</sup> dose vacinal e posteriormente às inoculações. A coleta realizada no décimo dia anterior à 1<sup>a</sup> dose vacinal foi denominada de pré-sangria. Tais procedimentos ocorreram nos seguintes momentos:

- Dia -10 (décimo dia anterior a 1<sup>a</sup> dose vacinal);
- Dia 1 (24 horas após a 1<sup>a</sup> dose vacinal);
- Dia 15 (24 horas após a 2<sup>a</sup> dose vacinal);
- Dia 44 (48 horas após a 4<sup>a</sup> dose vacinal);
- Dia 57 e 71 (dias das necropsias).

Todo material coletado foi enviado para o Laboratório Laborlife Análises Clínicas LTDA para análise dos parâmetros hematológicos, de coagulação e de bioquímica sérica. O processamento do material e análise foram acompanhados pela equipe técnica do Laboratório de Esquistossomose Experimental.

#### *4.3.4.1 Parâmetros bioquímicos*

O sangue foi coletado em tubo contendo gel separador. Os tubos foram centrifugados (3500rpm x 5min) no LEE/IOC, para obtenção do soro sanguíneo e posteriormente enviado para o Laboratório Laborlife. As análises bioquímicas foram realizadas em um analisador automático de bioquímica, marca Biomerieux, modelo Cline 150, por meio de métodos colorimétricos, enzimáticos ou de cinética – UV. Foram avaliados os seguintes parâmetros no soro: amilase, glicose, cálcio, cloro, fósforo, uréia nitrogenada, creatinina, proteínas séricas totais, albumina, globulinas, relação entre Albumina/globulina, creatinofosfoquinase - CK, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina – ALP, transaminase oxaloacética – AST/TGO, transaminase pirúvica - ALT/TGP e bilirrubina total. Para análise dos parâmetros potássio e sódio foi utilizado um fotômetro de chama marca CELM, modelo FC 180.

#### *4.3.4.2 Parâmetros hematológicos*

Para determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue dos coelhos foi coletado em tubos vacutainer® tampa roxa contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e analisado em um contador automático de células sanguíneas marca COULTER, modelo T-890. Duas lâminas com esfregaços sanguíneos foram também confeccionadas por animal, como forma de confirmar os achados automatizados, por meio de microscopia óptica. O microscópio utilizado para este procedimento foi da marca NIKON, modelo Eclipse E-200. Os seguintes parâmetros foram analisados: Hemograma completo (hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de plaquetas), leucócitos (valores absolutos e relativos); contagem de reticulócitos.

#### *4.3.4.3 Parâmetros de coagulação*

Para determinação dos parâmetros de coagulação, o sangue dos coelhos foi coletado em tubos vacutainer® tampa azul contendo citrato de sódio tamponado e analisado em coagulômetro marca Biomerieux, modelo Option 2. Para as provas de coagulação foram avaliados os parâmetros Tempo de Tromboplastina (PTT) e Tempo de Protrombina (PTB).

### 4.3.5 Avaliação sistêmica anatomopatológica

#### 4.3.5.1 Procedimento para necropsia

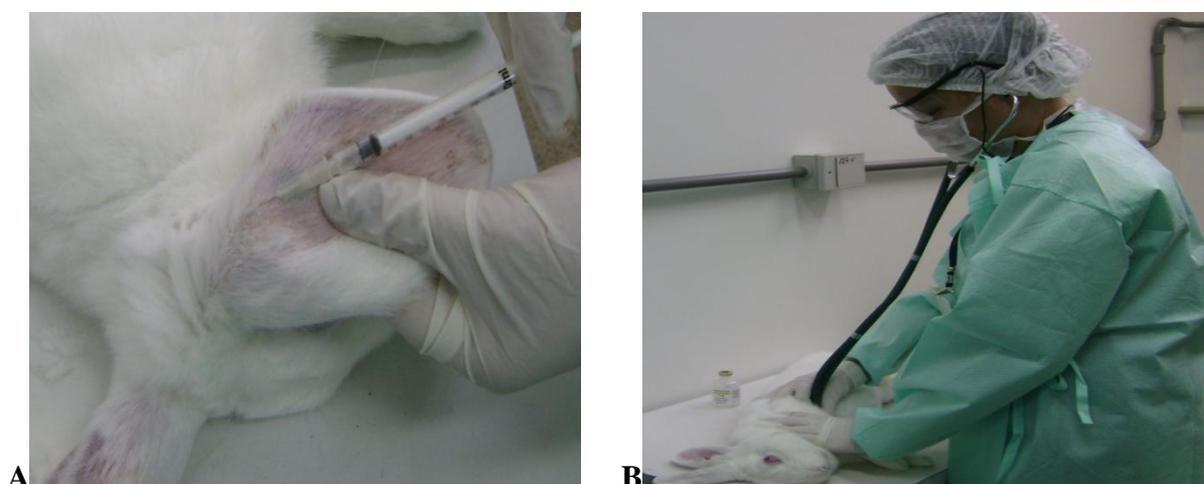
Cada coelho foi submetido a jejum na noite anterior ao procedimento de eutanásia. Um veterinário patologista do Biotério de Experimentação Animal do IOC acompanhou todos os procedimentos de eutanásia executados pela equipe técnica do LEE/IOC, de acordo com as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A necropsia foi realizada por profissionais da área vinculados ao laboratório LaborLife.

De acordo com o protocolo seguido no estudo, as necropsias foram realizadas no dia 57 e 71. Sendo que no dia 57 foi programado a eutanásia, seguida da necropsia de 14 coelhos (2 animais/sexo/grupo). Já no dia 71 seriam eutanasiados e necropsiados 8 coelhos, ou seja, 1 macho e 1 fêmea de cada grupo. Desta forma, sendo possível avaliar um efeito tóxico tardio do antígeno vacinal.

#### 4.3.5.2 Método de eutanásia

Foi administrado inicialmente para eutanásia, o anestésico Cetamina (cloridrato de cetamina 10%) 2,0ml/animal, via intramuscular. Posteriormente foi utilizado o tiopental 1g (tionembutal sódico) ressuspendido em 10ml de solução fisiológica (200mg/animal). Os animais receberam uma dose de 2,0ml de tiopental/4,5 kg, via venosa (Figura 13).

**Figura 13 – Procedimento de eutanásia nos coelhos**



Momento da eutanásia com tiopental via venosa (A) e exame para certificação do óbito do animal (B)

#### 4.3.5.3 Órgãos e tecidos coletados

As amostras de órgãos dos animais necropsiados foram encaminhadas para a análise anatomopatológica no Laboratório Laborlife Análises Clínicas LTDA.

Os tecidos foram colocados em solução tampão de formol 10% com pH neutro. Os órgãos analisados foram: epidídimo; próstata; vesícula seminal; útero; vagina; glândula; testículo e ovário; adrenal; locais lesionados; aorta; coração; cérebro (córtex cerebelar, cerebral e medular); olhos com nervo óptico; nervo periférico (ciático); cordão espinhal (níveis cervical, torácico e lombar); intestino grosso (reto, colo e região cecal); intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo); orelhas esquerda e direita; esôfago; fêmur (incluindo superfície articular e medula óssea); esterno; vesícula biliar; rins; bexiga; fígado (2 lóbulos examinados; 3 secções coletadas); pulmão com brônquios \*\*; traquéia; glândula mamária \* ; pele (região mamária e local de imunização); nódulo linfóide mandibular; nódulo linfóide mesentérico (nódulo linfóide distal); nódulo linfóide ilíaco \*; pâncreas; pituitária; músculo esquelético (paravertebral); baço; estômago; timo; tireóide e paratireóide \*\*\*. Os órgãos submetidos à pesagem foram: adrenal; cérebro; coração; rins; fígado; pulmões; ovários; pituitária; baço; testículo; timo e tireóide/paratireóide. Os órgãos encontrados aos pares foram pesados juntos.

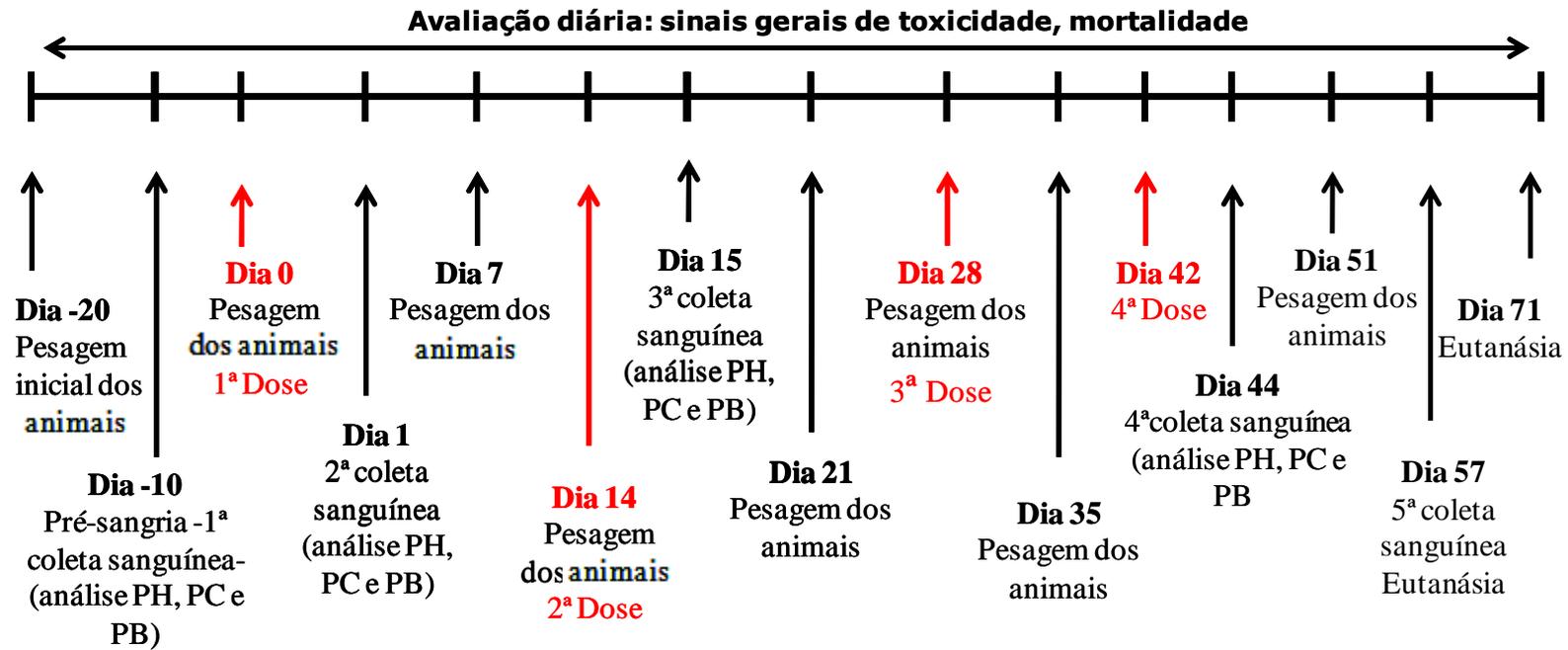
A Figura 14 sumariza o delineamento experimental utilizado neste trabalho.

\* Tecidos que não puderam ser identificados com facilidade a olho nu, devido à variação fisiológica de tamanho. No entanto, a região desses órgãos pôde ser fixada para avaliação microscópica.

\*\* Os pulmões foram inflados com formol via traquéia.

\*\*\* A glândula paratireóide não pôde ser identificada macroscopicamente. Elas foram examinadas no plano da secção.

Figura 14 - Resumo esquemático do protocolo de avaliação toxicológica do antígeno r-Sm14 e adjuvante LIPID A (GLA) em coelhos



PH: parâmetros hematológicos; PC: parâmetros de coagulação; PB: parâmetros bioquímicos

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos na evolução ponderal e nas determinações bioquímica, hematológica e dos parâmetros de coagulação, foi realizada avaliando separadamente machos e fêmeas, por meio de uma comparação entre os grupos de estudo no mesmo intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo.

Na comparação dos resultados entre e dentro dos grupos foi empregado a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Para as variáveis que apresentavam amostras menores, os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, para avaliar se houve diferença significativa entre os grupos (2 a 2) (SIEGEL, 1975).

Para comparação das médias entre os machos e as fêmeas nos diferentes grupos e intervalos de tempo, foram utilizados o teste “t-student” não-pareado e o teste de Dunn.

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.00, Prism inc. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Para representação gráfica das diferenças significativas entre os grupos de estudo no mesmo intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo, símbolos foram utilizados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE OFTALMOLÓGICA

Não foi observada nenhuma anormalidade durante o exame, porém, os animais ficaram muito estressados com o procedimento (Figura 12A e B). Ao final do procedimento realizado em todos os animais, a pupila já se encontrava menos dilatada, visto que o estresse diminuía com o passar do tempo de manipulação dos mesmos. Sete dias após o exame, a pupila dos coelhos normalizou totalmente.

### 5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foi observado diariamente, o aspecto físico e o nível de estresse dos animais. Um coelho do grupo D (PBS/controle) começou com quadro diarréico após a 1ª inoculação, normalizando antes da 2ª inoculação. Um coelho do grupo C (GLA) também apresentou fezes amolecidas, porém normalizando seis dias antes da 3ª dose. Este mesmo animal, dois dias depois da 3ª dose quase não defecava, porém, 24 horas depois foi observado presença de fezes em quantidades suficientes e de aspecto normal. Um coelho do grupo A (Sm14 Pp + GLA), ao final do estudo apresentava coriza, abrindo muito a boca ao respirar. Estes fatos foram considerados eventos pontuais e não relacionados com o processo de vacinação, além do que não foram encontrados nos estudos anatomopatológicos desses coelhos achados relacionados ao sistema digestório e respiratório.

Ocorreram três óbitos durante o estudo, um animal do grupo A (Sm14 Pp + GLA), um do grupo C (GLA) e um do grupo D (PBS/controle). Os animais dos grupos A e D, macho e fêmea respectivamente, sofreram fratura da coluna lombar ao serem manipulados, tendo sido submetidos à eutanásia pela equipe técnica do LEE na presença de um veterinário patologista. A fratura ocorreu após a inoculação da 1ª dose para o coelho do grupo A e antes da inoculação da 3ª dose para o coelho do grupo D. Nesses dois casos, houve um acidente relacionado à manipulação e contenção dos animais, no processo de imobilização dos animais para realização das sangrias, que são feitas na veia central da orelha. Para a imobilização dos animais pelo método recomendado, em caixa de contenção, pode ocorrer, trauma na coluna, devido à movimentação forte do animal, principalmente se este for de tamanho menor em relação à caixa de contenção. Dessa forma, não existe absolutamente nenhuma relação entre a vacinação e a fratura lombar verificada nos casos de óbito dos coelhos.

O terceiro óbito ocorreu com uma coelha do grupo C (GLA) sete dias após a inoculação da 4ª dose. Este animal apresentava-se estressado e ofegante, porém, se alimentava e defecava normalmente. O corpo do animal foi encaminhado à equipe de médicos veterinários patologistas do CECAL para realização de uma necropsia. Observou-se um quadro de hiperemia e presença de macrófagos com pigmento acastanhado intracitoplasmático nos pulmões, traquéia e fígado. Os demais órgãos não apresentavam alterações anatomopatológicas significativas.

### 5.3 EVOLUÇÃO PONDERAL

Na avaliação do peso corporal dos animais ao longo deste trabalho, não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quando se comparou os pesos por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

A maioria dos animais não apresentou ganho de peso evidente e nenhum animal apresentou perda de peso considerável ao final do estudo quando comparado ao peso do dia 0 (dia da 1ª dose vacinal). As fêmeas do grupo A (Sm14 *Pp* USA + GLA) apresentaram uma perda de peso de 3,73%, correspondente a 150 gramas, enquanto que o ganho de peso observado no grupo A (Sm14 *Pp* USA + GLA) dos machos foi de 0,72%, correspondente a 25 gramas (Tabela 2), embora não tenha sido observado alterações significativas no consumo de ração e ingestão de água entre os animais dos quatro grupos do estudo. O ganho de peso dos machos do grupo A só foi observado a partir de 35 dias. No grupo B (Sm14 *Ec* Bra + GLA) ocorreu uma perda de peso tanto para os machos quanto para as fêmeas, com 3,32% (120 gramas) e 3,82% (170 gramas) respectivamente (Tabela 2). No grupo C (somente adjuvante GLA) ocorreu um ganho de peso dos machos de 18,44% (630 gramas) e das fêmeas de 25,40% (950 gramas). O ganho de peso também foi observado no grupo D (Solução salina – PBS), com 5,23% (187 gramas) para os machos e 38,34% (1,052 gramas) para as fêmeas (Tabela 2).

A média do peso em Kg dos coelhos machos e fêmeas nos diferentes intervalos de tempo está representada na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação do peso corporal dos coelhos (Kg)

| Sexo   | Grupo experimental    | Dia - 20   | Dia 0      | Dia 7      | Dia 14     | Dia 21     | Dia 28      | Dia 35     | Dia 42     | Dia 51     | Dia 0-51     | Dia 0-51                   |
|--------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|--------------|----------------------------|
|        |                       | Peso (Kg)   | Peso (Kg)  | Peso (Kg)  | Peso (Kg)  | Peso (Kg)    | Ganho /Perda<br>Peso (g) * |
| machos | Sm14Pp +<br>GLA-SE    | 3.340±0,16 | 3.465±0,01 | 3.235±0,03 | 3.295±0,02 | 3.295±0,03 | 3.295±0,005 | 3.385±0,03 | 3.420±0,02 | 3.490±0,02 | 25±25,00     | 0,72                       |
| fêmeas | Sm14Pp +<br>GLA-SE    | 3.283±0,17 | 4.023±0,22 | 3.600±0,24 | 3.733±0,26 | 3.760±0,28 | 3.823±0,25  | 3.837±0,20 | 3.920±0,19 | 3.873±0,21 | -150±68,39   | -3,73                      |
| machos | Sm14Ec +<br>GLA-SE    | 3.173±0,06 | 3.613±0,06 | 3.340±0,08 | 3.360±0,07 | 3.433±0,06 | 3.467±0,06  | 3.543±0,08 | 3.533±0,05 | 3.493±0,22 | -120±137,50  | -3,32                      |
| fêmeas | Sm14Ec +<br>GLA-SE    | 3.667±0,09 | 4.447±0,03 | 4.063±0,14 | 4.143±0,19 | 4.133±0,16 | 4.143±0,21  | 4.310±0,20 | 4.257±0,19 | 4.277±0,26 | -170±148,10  | -3,82                      |
| machos | GLA-SE<br>(Adjuvante) | 3.367±0,18 | 3.417±0,21 | 3.603±0,24 | 3.647±0,25 | 3.703±0,29 | 3.767±0,28  | 3.897±0,28 | 3.997±0,29 | 4.047±0,26 | 630±63,51    | 18,44                      |
| fêmeas | GLA-SE<br>(Adjuvante) | 3.610±0,12 | 3.740±0,18 | 3.857±0,22 | 3.870±0,23 | 3.990±0,21 | 3.710±0,51  | 4.203±0,23 | 4.247±0,07 | 4.690±0,01 | 950±270,81   | 25,40                      |
| machos | PBS<br>(Controle)     | 3.253±0,26 | 3.567±0,17 | 3.387±0,22 | 3.407±0,27 | 3.150±0,12 | 3.540±0,27  | 3.670±0,27 | 3.720±0,28 | 3.753±0,29 | 187±138,60   | 5,23                       |
| fêmeas | PBS<br>(Controle)     | 2.543±0,41 | 2.743±0,59 | 2.753±0,50 | 2.857±0,48 | 3.255±0,54 | 3.420±0,56  | 3.025±0,04 | 3.610±0,50 | 3.795±0,38 | 1.052±300,00 | 38,34                      |

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. O parâmetro foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, para comparação das médias dos pesos entre machos e fêmeas nos diferentes grupos e intervalos de tempo, foi utilizado o teste de Dunn. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$

\*: Diferença entre as médias dos pesos do dia 51 e dia 0 ± erro padrão das diferenças

## 5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

De acordo com o protocolo utilizado neste estudo, baseado em normas do FDA e em orientações da EMEA, foram analisados os principais parâmetros bioquímicos de interesse em estudo de toxicidade de doses repetitivas.

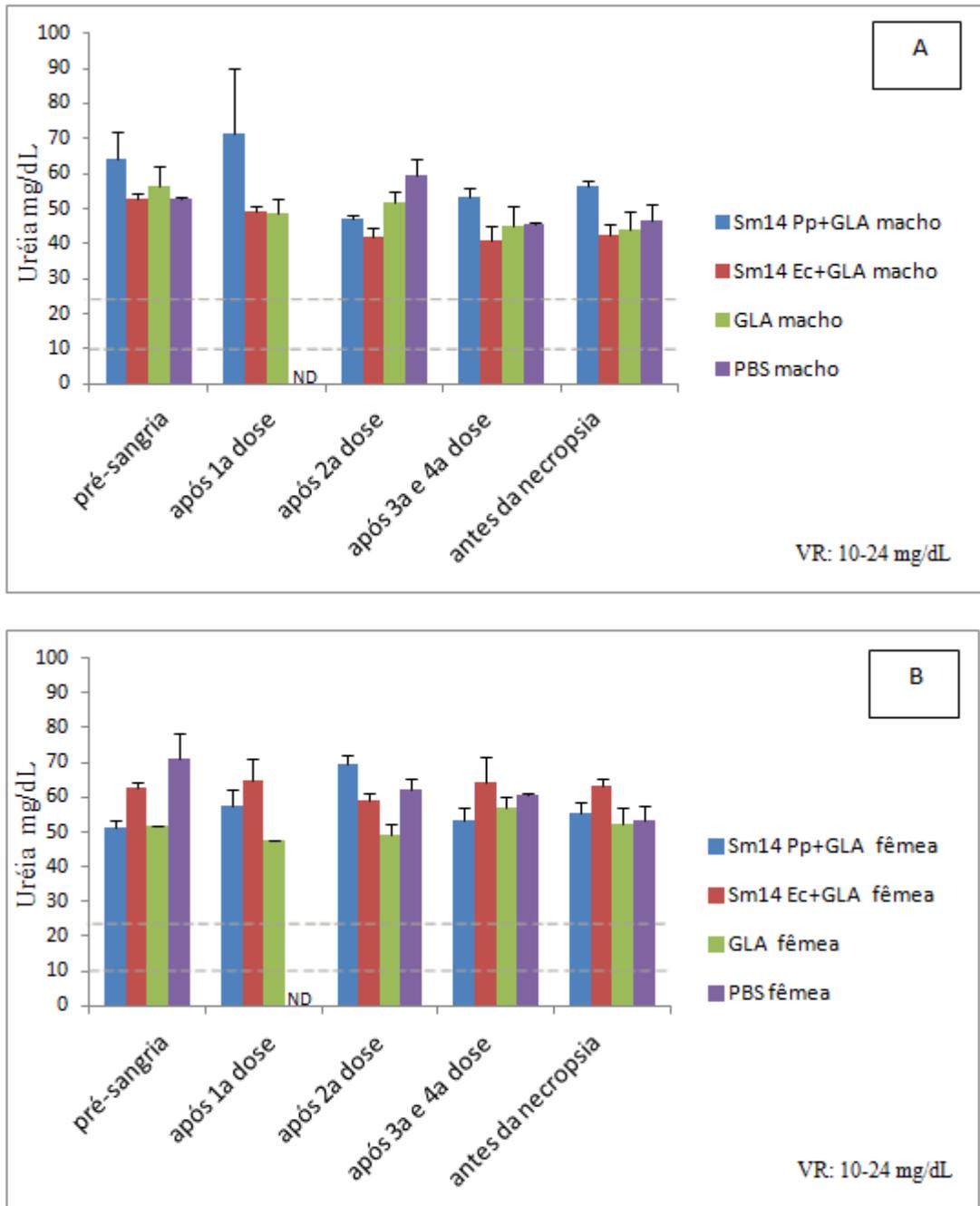
### 5.4.1 Uréia e creatinina

As principais provas bioquímicas para avaliação da função renal incluem a determinação da uréia e creatinina séricas/plasmáticas, estes analitos atuam como marcadores de possível alteração na taxa de filtração glomerular, servindo como parâmetros de evolução da doença (EMANUELLI et al., 2008).

Todos os animais apresentaram níveis de uréia acima do valor normal (Figura 15A e B) desde a pré-sangria até o final do estudo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quanto aos níveis de uréia, quando se efetuou uma comparação entre os sexos, encontrou-se diferença estatística significativa segundo o teste t student não pareado quando avaliou-se o grupo *Sm14Pp+GLA* após a 2ª dose, o grupo *Sm14Ec+GLA* na pré-sangria, após 2ª dose e antes da necropsia e o grupo PBS após a 4ª dose.

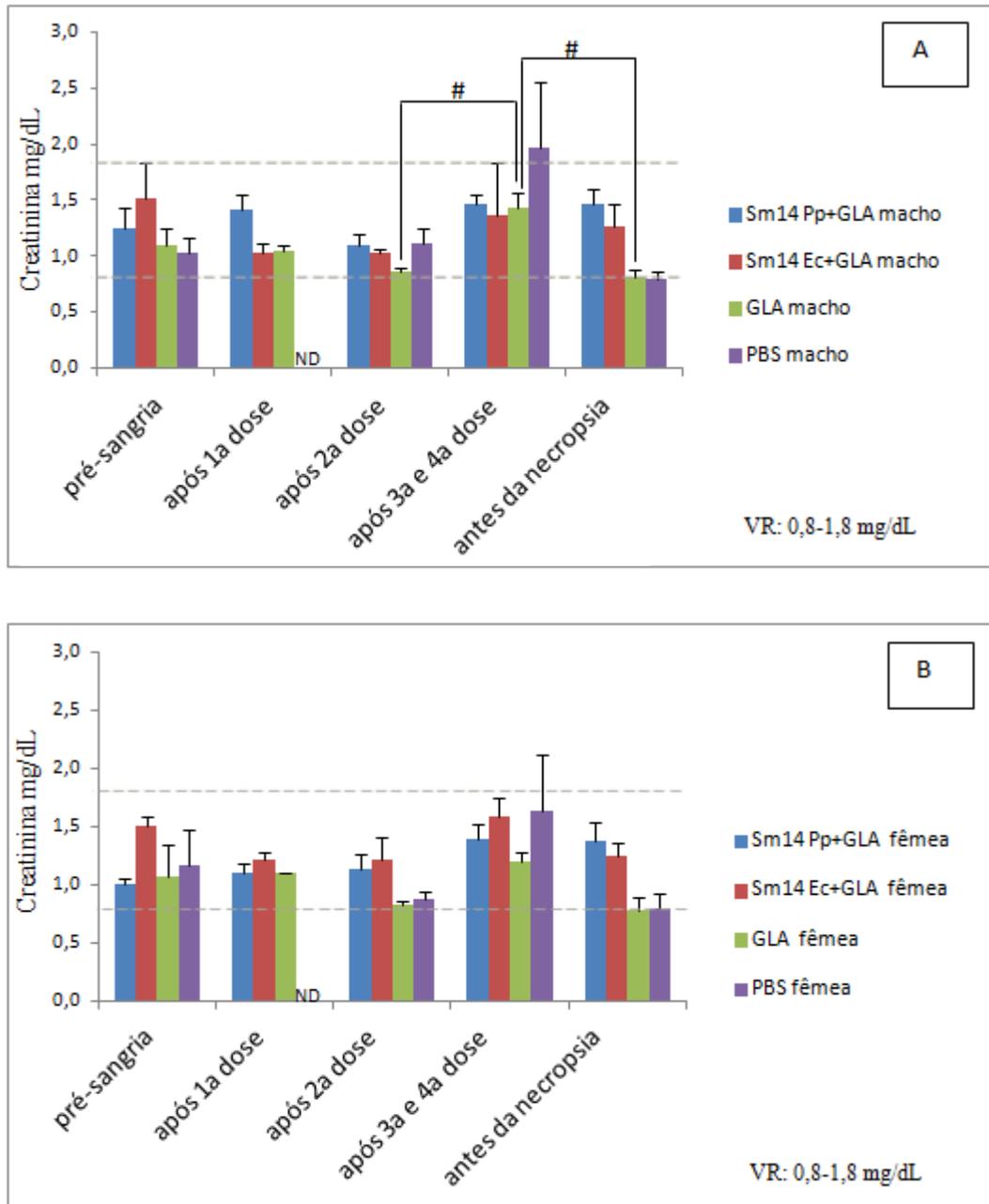
Com relação à dosagem de creatinina, com exceção do grupo D (controle) dos machos após a 4ª dose, todos os grupos apresentaram níveis de creatinina dentro da faixa de normalidade. No grupo B (*Sm14 Ec + GLA*) de machos e fêmeas (Figura 16A e B), os níveis de creatinina foram menores após a 1ª e 2ª doses comparados a pré-sangria, com recuperação após a 3ª e 4ª doses e diminuição dos níveis antes da necropsia. Observou-se no grupo C (*GLA*) dos machos um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a inoculação da 2ª dose e 4ª dose. Posteriormente, ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa deste grupo, quando se comparou os níveis de creatinina sérica das amostras coletadas após a inoculação da 4ª dose e antes da necropsia. Não houve diferença estatística significativa, quando comparamos os machos e as fêmeas, nos intervalos de tempo por grupos de estudo, segundo o teste t student não pareado.

Figura 15 – Níveis séricos de uréia



As dosagens dos níveis de uréia em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de uréia para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra

Figura 16 – Níveis séricos de creatinina



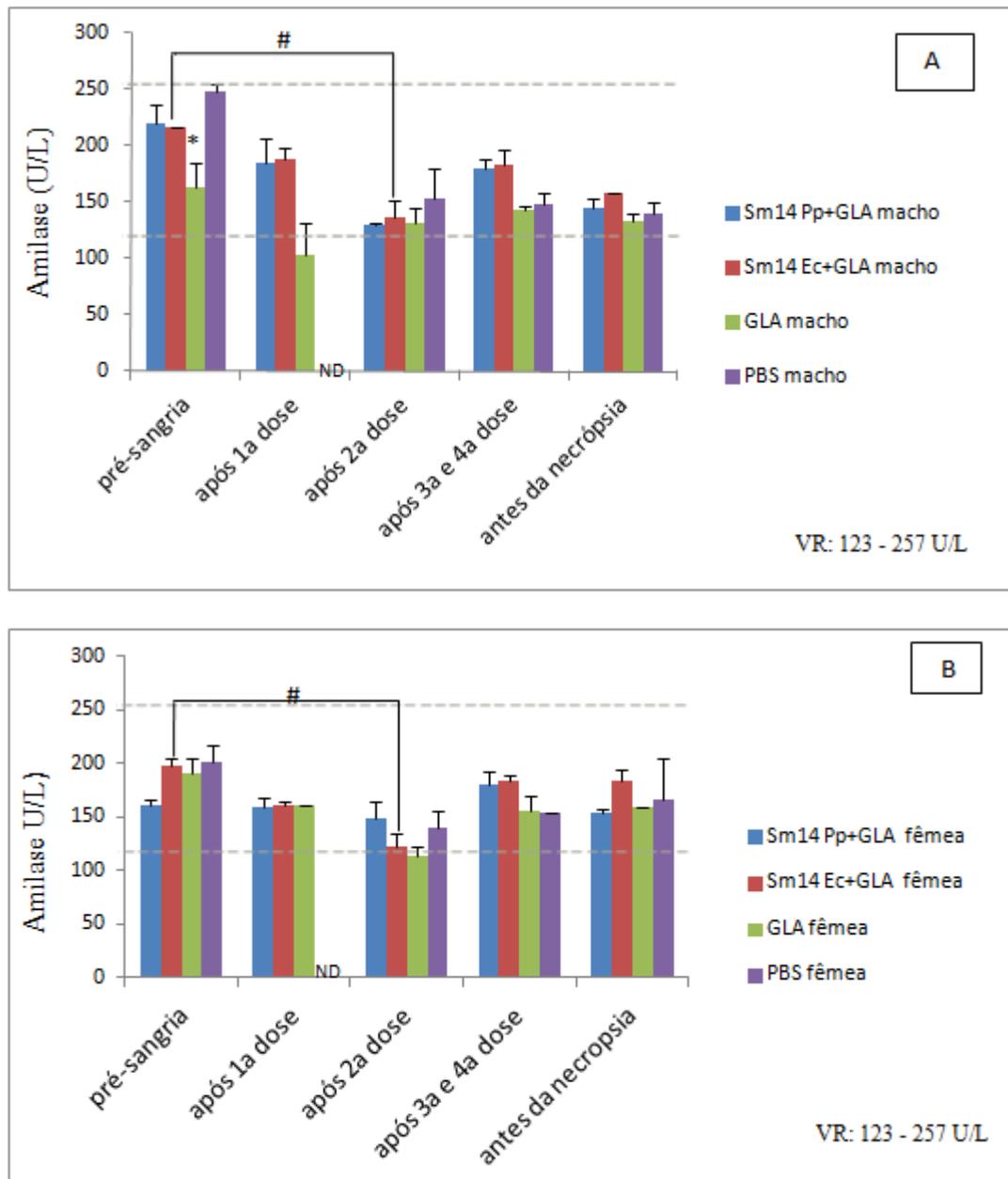
As dosagens dos níveis de creatinina em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de Creatinina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.4.2 Amilase

As dosagens de amilase sérica são amplamente utilizadas no diagnóstico de doenças do pâncreas e na investigação da função pancreática (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Em todos os grupos, tanto para os machos quanto para as fêmeas (Figura 17A e B), os níveis de amilase, embora dentro dos padrões de normalidade (exceto para o grupo C – GLA- dos machos e das fêmeas após a 1ª e 2ª doses respectivamente) diminuiram após a 1ª e 2ª doses, com recuperação após 3ª e 4ª dose. Porém, os machos antes da necropsia, apresentaram novamente uma redução dos níveis de amilase nos 4 grupos. Observou-se que a redução citada nos níveis da amilase foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente para o grupo B (Sm14Ec+GLA) de machos e fêmeas quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes à pré-sangria e após aplicação da segunda dose. Foi observado no grupo dos machos, um aumento estatisticamente significativo quando se comparou o grupo C (GLA) em relação ao grupo D (PBS) no intervalo referente à pré-sangria. Quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 17 – Níveis séricos de amilase



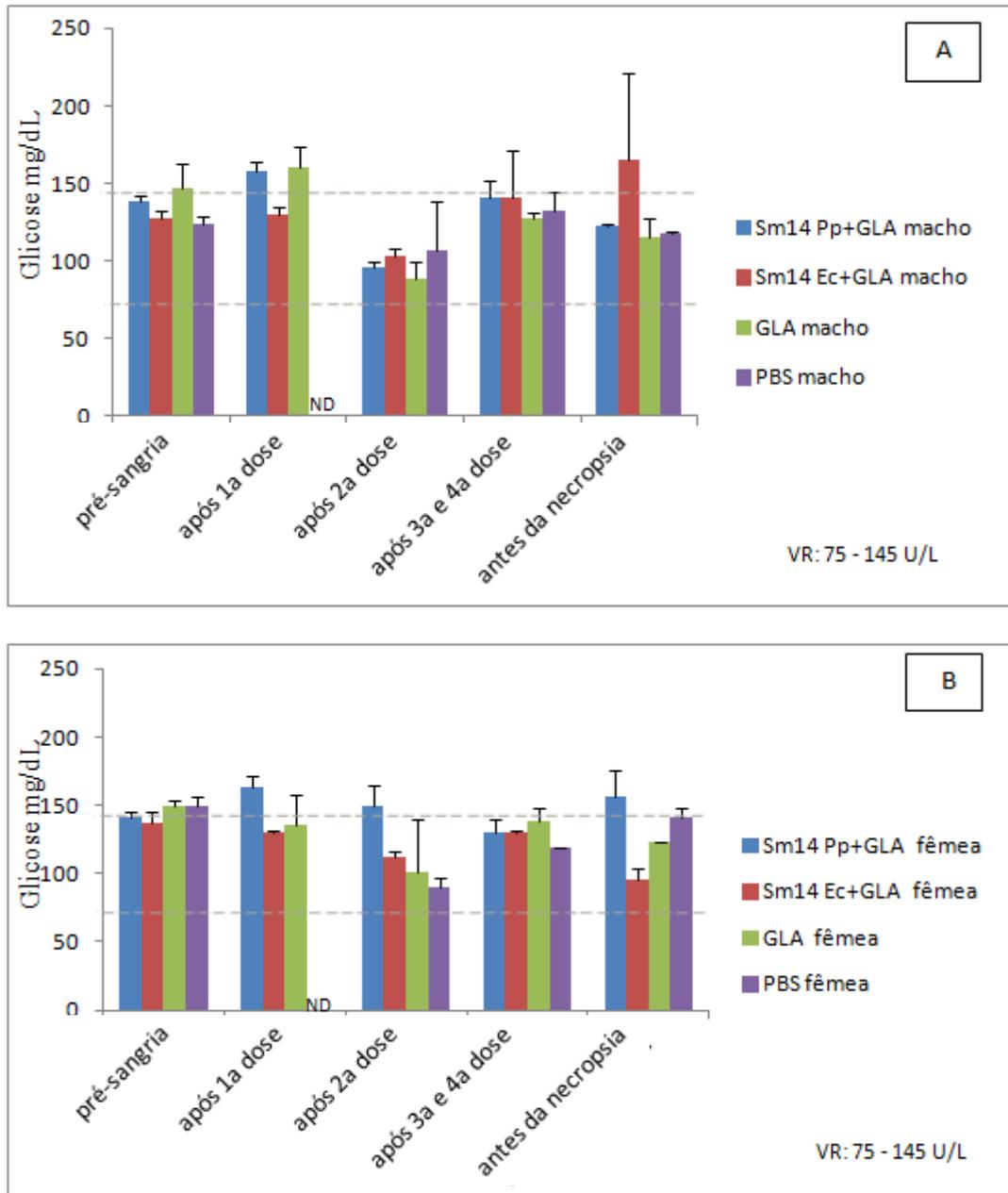
As dosagens dos níveis de amilase em U/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de amilase para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

### 5.4.3 Glicose

A concentração de glicose no sangue é regulada por um sistema hormonal extremamente sensível, o que confere à dosagem de glicose um importante papel em diagnósticos (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Tanto o grupo dos machos, quanto o das fêmeas imunizados somente com o adjuvante GLA iniciaram o experimento com níveis de glicose superior ao limite normal (Figura 18A e B). As fêmeas do grupo controle, imunizadas somente com PBS, também apresentaram níveis superiores antes do inóculo. Os machos e as fêmeas do grupo imunizado com Sm14 *Pp*+GLA apresentaram um aumento após a 1ª dose e decréscimo após 2ª dose. Os machos do grupo A (Sm14 *Pp*+GLA) ao final do estudo apresentavam os índices normalizados, porém nas fêmeas foram encontrados níveis acima dos valores normais. Com exceção dos machos antes da necropsia, todos os animais imunizados com Sm14 *Ec* + GLA apresentaram níveis de glicose dentro dos padrões de normalidade. Verificou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os níveis de glicose do grupo B (Sm14 *Ec* + GLA) das fêmeas e do grupo C (GLA) dos machos nos diferentes intervalos de tempo. Após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis foi realizado o teste de Dunn, que trata-se de uma análise complementar para apontar quais grupos testados seriam significativamente diferentes entre si. Porém, o teste de Dunn não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo B (fêmeas) e C (machos). Quanto aos níveis de glicose, quando efetuou-se uma comparação por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 18 – Níveis séricos de glicose



As dosagens dos níveis de glicose mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR:** representa o valor de referência de glicose para coelhos. **ND:** representa insuficiência de amostra.

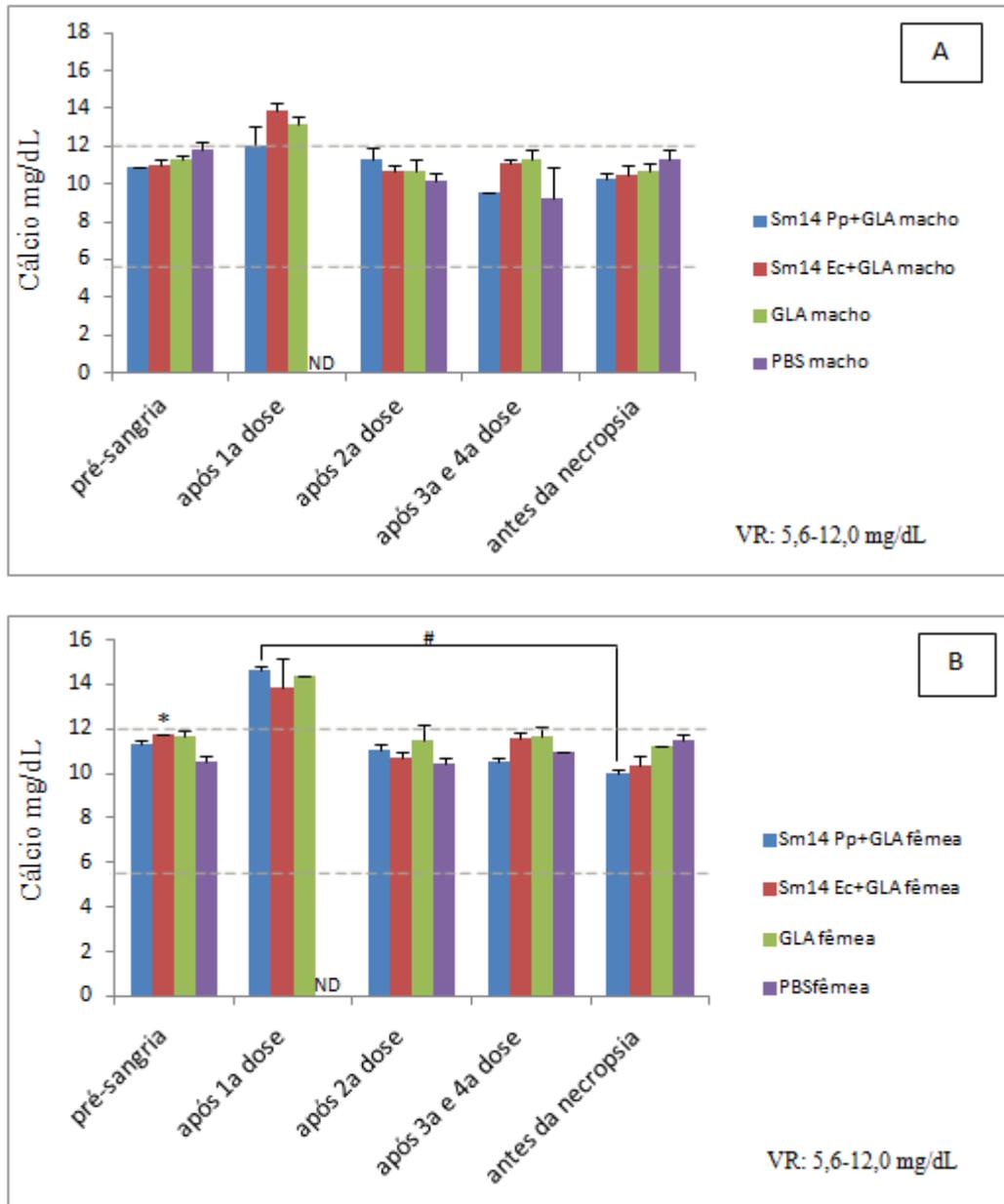
#### 5.4.4 Cálcio e fósforo

A determinação dos teores de cálcio e fósforo séricos representa importância clínica, pois as alterações da calcemia e da fosfatemia estão relacionadas geralmente a distúrbios metabólicos ou endócrinos. O estudo em conjunto destes elementos se justifica pela íntima correlação existente entre ambos (MILLER; GONÇALVES, 1999).

A maioria dos coelhos apresentou concentrações de cálcio dentro do limite da normalidade (Figura 19A e B). Observou-se nas fêmeas uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do cálcio entre os grupos B (Sm14Ec + GLA) e D (PBS/Controle) na pré-sangria, e no grupo A (Sm14Pp + GLA), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a 1ª dose e antes da necropsia (Figura 19B). Verificou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os níveis de cálcio do grupo B (Sm14 Ec + GLA) das fêmeas nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn, utilizado para comparações múltiplas entre os grupos (2 a 2), não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo B (Figura 19B). Quanto aos níveis de cálcio, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

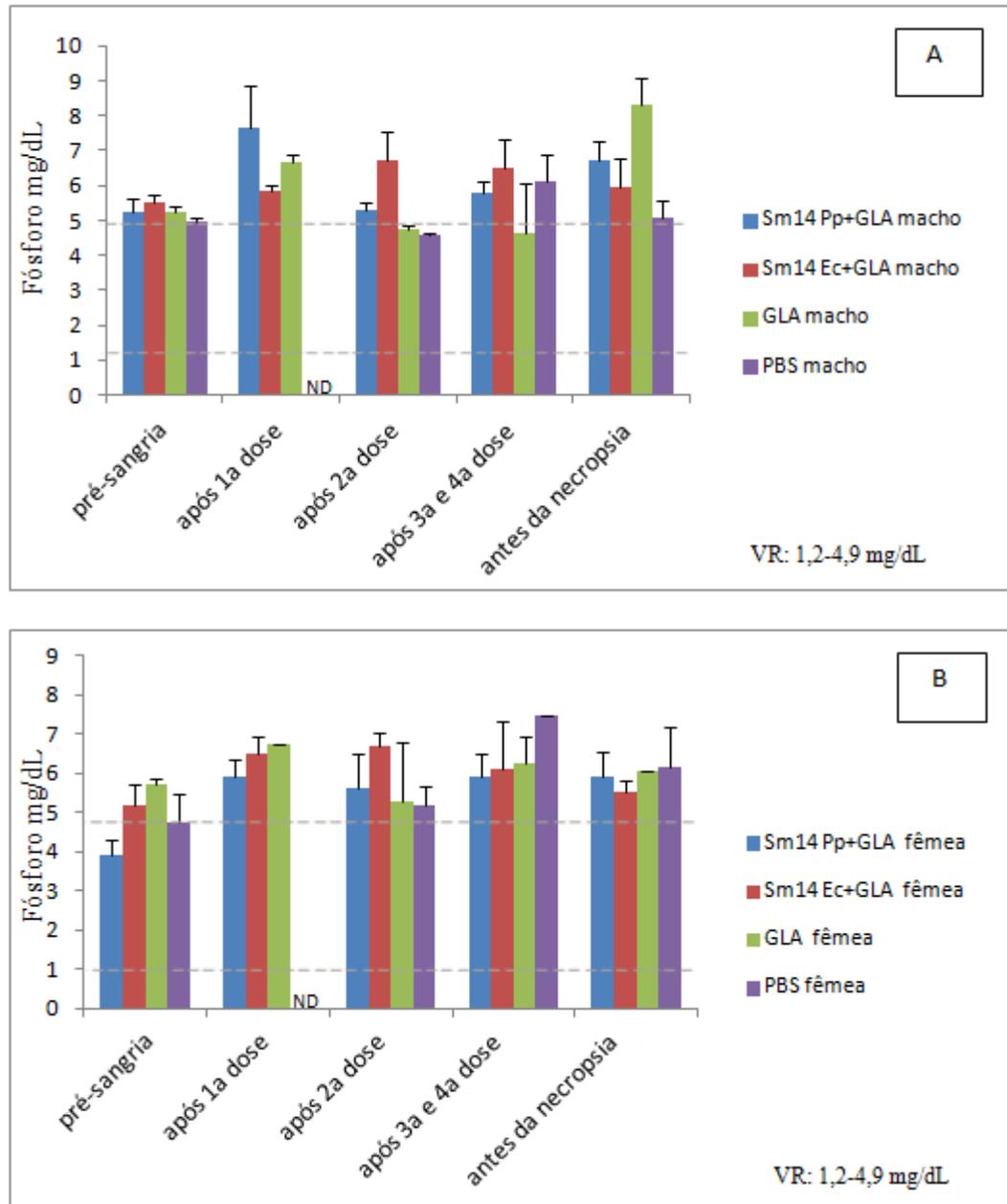
Com relação aos níveis de fósforo, foi observado nos grupos dos machos e das fêmeas níveis elevados desde a pré-sangria até o final do estudo (Figura 20A e B). As fêmeas dos grupos A (Sm14 Pp + GLA) e controle, embora tenham começado o experimento com níveis de fósforo dentro da normalidade, ao final do estudo encontravam-se aumentados. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quanto aos níveis de fósforo, quando comparou-se por sexo, também não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 19 – Níveis séricos de cálcio



As dosagens dos níveis de cálcio mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de cálcio para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 20 – Níveis séricos de fósforo



As dosagens dos níveis de fósforo em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR:** representa o valor de referência de fósforo para coelhos. **ND:** representa insuficiência de amostra.

#### 5.4.5 Cloro, potássio e sódio

Os íons cloro, potássio e sódio estão envolvidos na manutenção da pressão osmótica e no balanço hidroeletrolítico, sofrem alterações nos distúrbios hidroeletrolíticos ocasionados por nefropatias, desidratações, vômitos, diarréias entre outras (MILLER; GONÇALVES, 1999).

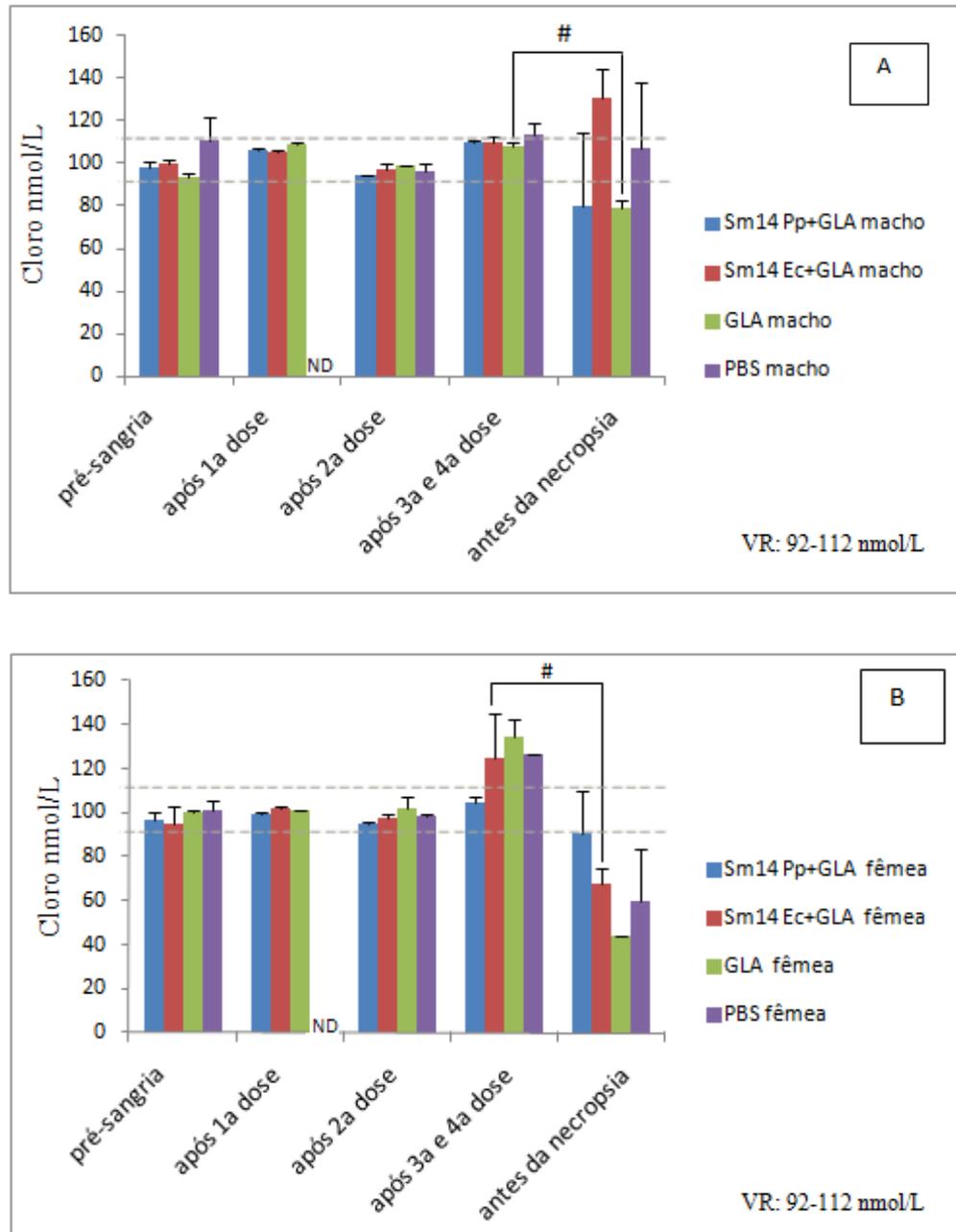
Os soros dos coelhos machos e das fêmeas apresentaram no início do experimento níveis de cloro dentro do limite normal (Figura 21A e B), porém, ao final do estudo foi encontrado um aumento no grupo dos machos imunizados com Sm14 *Ec* + GLA e reduzidos nos grupos Sm14 *Pp* + GLA e GLA (Figura 21A). Observou-se nos grupos das fêmeas, exceto no grupo Sm14 *Pp* + GLA, um aumento nos níveis de cloro após a 4ª dose e uma diminuição ao final do estudo (Figura 21B). Na avaliação do parâmetro cloro, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa do cloro no grupo B (Sm14 *Ec*+GLA) das fêmeas (Figura 21B) e no grupo C (GLA) dos machos (Figura 21A), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes ao período posterior à inoculação da 4ª dose e antes da necropsia. Verificou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os níveis de cloro do grupo B (Sm14 *Ec* + GLA) dos machos nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn, utilizado para comparações múltiplas entre os grupos (2 a 2), não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo B (Figura 21A). Quanto aos níveis de cloro, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Todos os animais apresentaram concentrações de potássio dentro do limite da normalidade (Figura 22A e B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quanto aos níveis de potássio, quando comparou-se por sexo, também não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Com relação aos níveis de sódio, os grupos controle (grupo D/PBS) e Sm14 *Pp* + GLA (Grupo A) dos machos (Figura 23A) e todas as fêmeas (Figura 23B) apresentaram níveis de sódio acima do valor normal na pré-sangria, porém, ao final do estudo os níveis de sódio de todos os animais encontravam-se normalizados. Na avaliação do parâmetro sódio, observou-se nos machos uma diminuição estatisticamente significativa do sódio nos grupos A

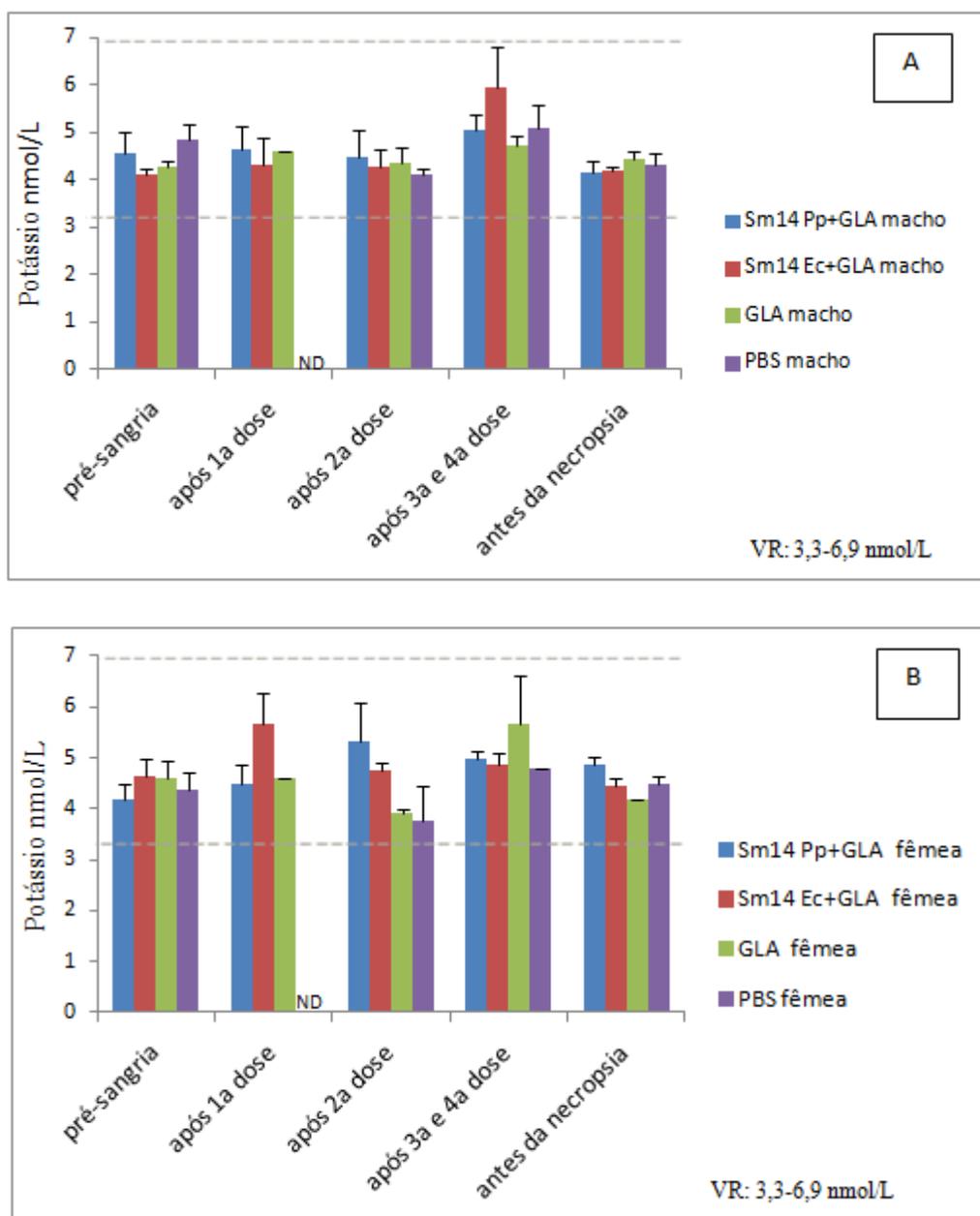
(Sm14Pp+GLA) e B (Sm14Ec+GLA) quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes ao período posterior à inoculação da 1ª dose e antes da necropsia e entre os períodos após a 1ª dose e 2ª dose, respectivamente. Quanto aos níveis de sódio, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 21 – Níveis séricos de cloro



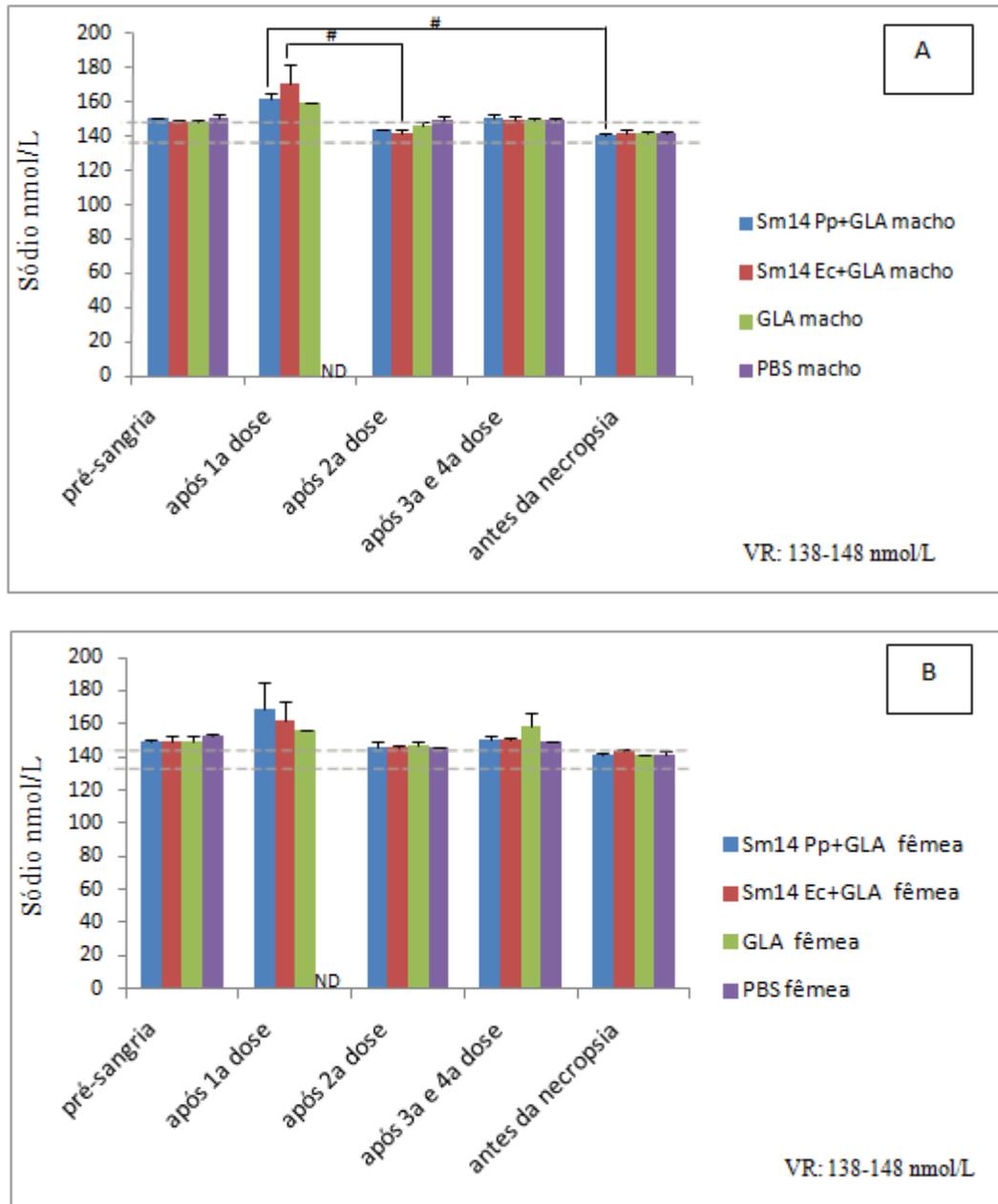
As dosagens dos níveis de cloro em nmol/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de cloro para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 22 – Níveis séricos de potássio



As dosagens dos níveis de potássio em nmol/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de potássio para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 23 – Níveis séricos de sódio



As dosagens dos níveis de sódio em nmol/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de sódio para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.4.6 Proteínas totais, albumina, globulina e relação albumina/globulina

As proteínas totais do plasma e suas frações são essenciais para a manutenção da pressão osmótica e têm diversas funções no organismo, o que inclui ação enzimática, hormonal, autoimune, fatores de coagulação, e de transporte através de suas ligações no sangue com substâncias hormonais ou não hormonais. Sua dosagem fornece um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e para a presença de doenças sistêmicas severas (MILLER; GONÇALVES, 1999).

A maioria dos coelhos apresentou níveis de proteínas totais dentro do limite da normalidade (Figura 24A e B). Observou-se uma redução nos níveis de PT no final do estudo (antes da necropsia), principalmente nos machos e nas fêmeas do grupo vacinal Sm14 *Pp* + GLA. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quanto aos níveis de PT, quando comparou-se por sexo, também não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste t-student não pareado.

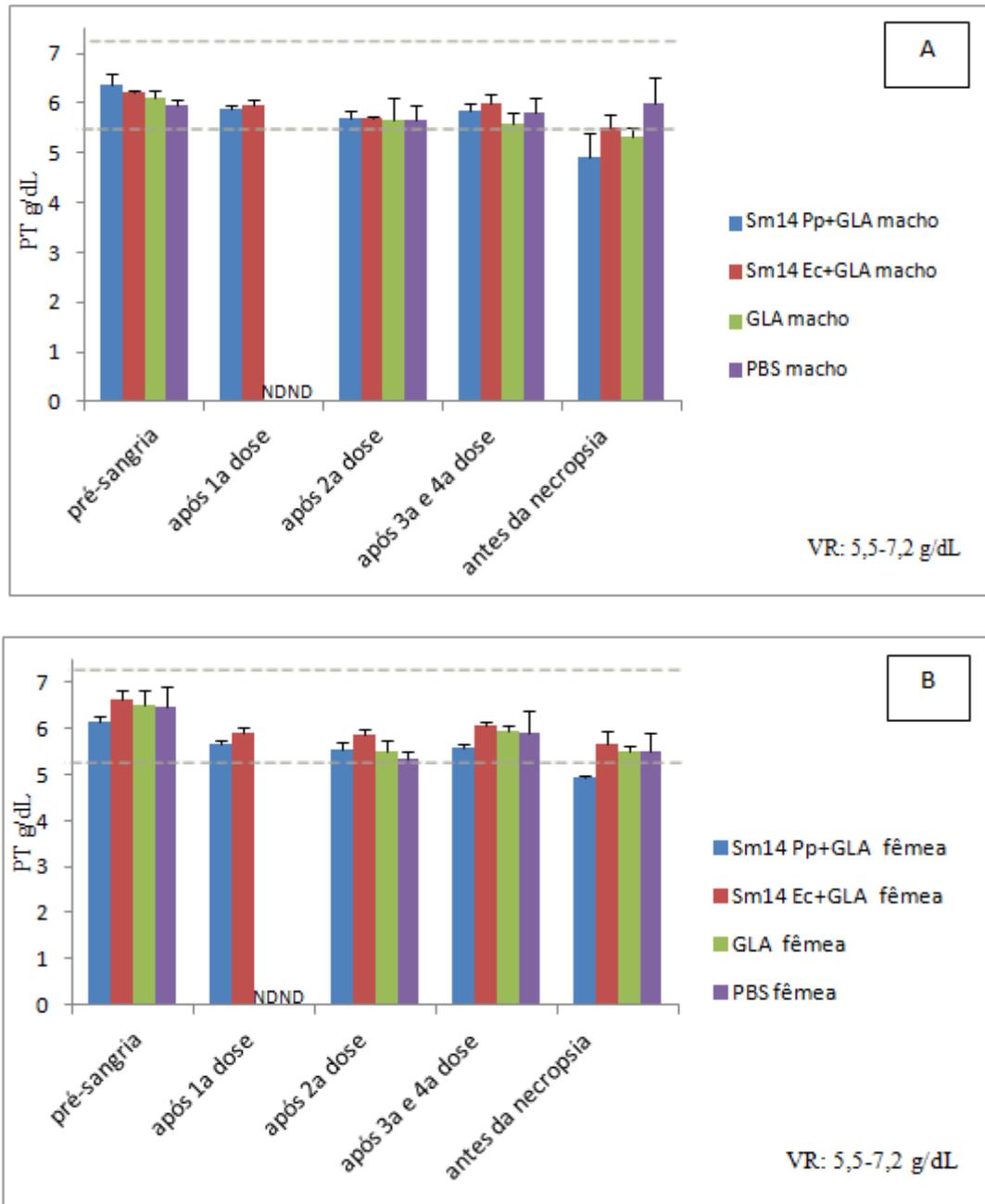
No início do estudo, verificou-se uma pequena redução nos níveis de albumina em todos os grupos dos machos e das fêmeas (Figura 25A e B), com recuperação a partir da 3ª e 4ª doses tanto para os machos quanto para as fêmeas. Observou-se nos grupos B (Sm14*Ec*+GLA) e D (Controle/PBS) dos machos um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a inoculação da 2ª dose e antes da necropsia. Nas fêmeas também foi observado um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos A (Sm14*Pp*+GLA), B (Sm14*Ec*+GLA) e D (Controle/PBS), separadamente, quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a inoculação da 2ª dose e antes da necropsia. Quanto aos níveis de albumina, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

O valor de globulina é calculado a partir dos valores de proteína total e albumina ( $PT = \text{albumina} + \text{globulina}$ ). O valor de referência utilizado foi de 1,5 – 2,8 g/dL. Todos os grupos mostram uma redução de globulina até o final do estudo (Figura 26A e B). Observou-se nos machos uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da globulina no grupo C (GLA), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a 2ª dose e antes da necropsia. Verificou-se também uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os níveis de globulina do grupo B (Sm14 *Ec* + GLA) dos machos nos diferentes intervalos de tempo. Foi realizado o teste de Dunn, que trata-se de uma

análise complementar para apontar quais grupos testados seriam significativamente diferentes entre si. Porém, o teste de Dunn não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo B. Nas fêmeas foi verificado uma redução estatisticamente significativa no grupo A (Sm14Pp+GLA), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos da pré-sangria e antes da necropsia e no grupo B (Sm14Ec+GLA), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos da pré-sangria e antes da necropsia e após a 2ª dose e antes da necropsia. Quanto aos valores de globulina, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

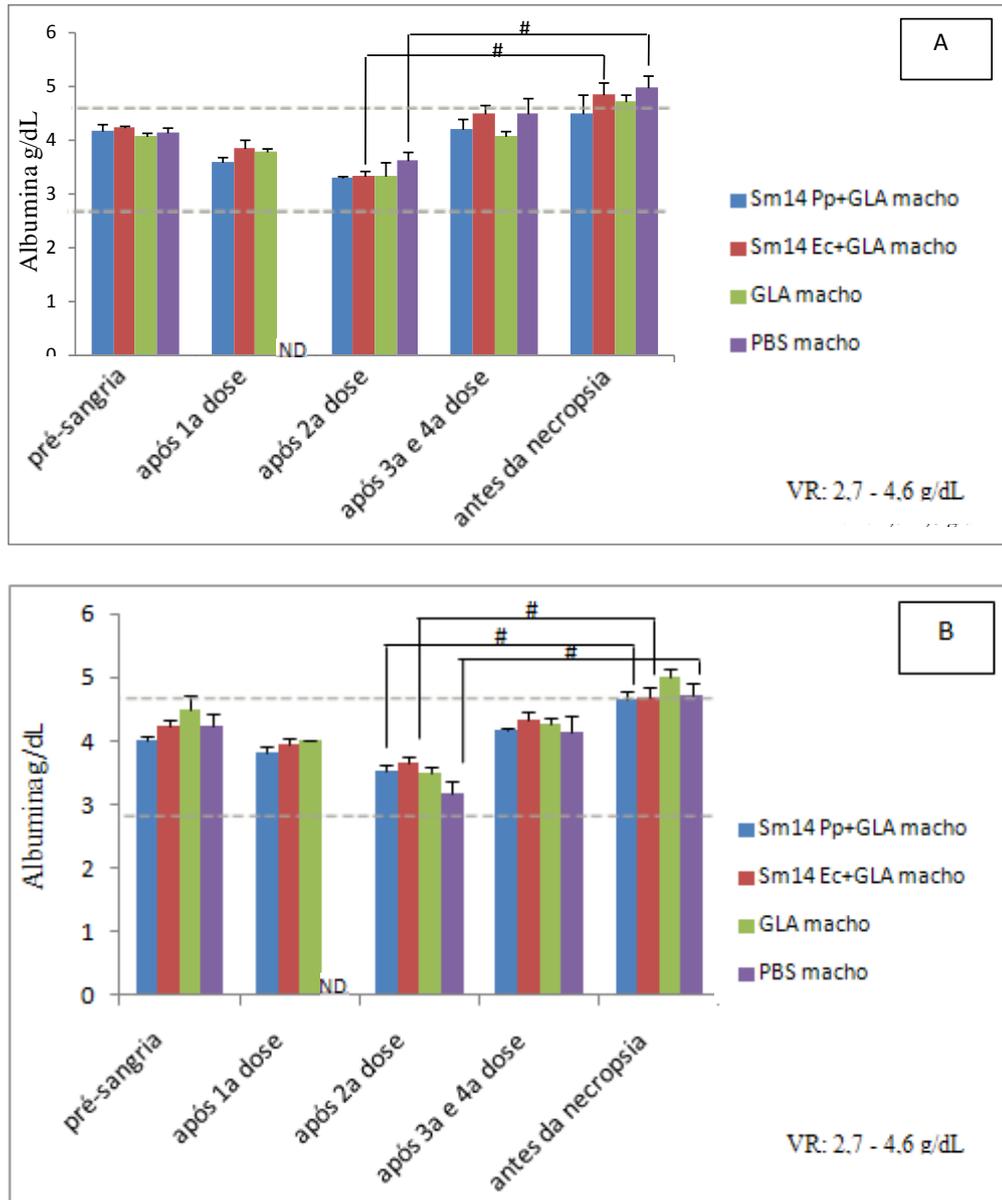
Em todos os grupos, a relação albumina/globulina foi maior a partir da 3ª e 4ª doses, alcançando valores bem elevados antes da necropsia (Figura 27A e B). O grupo Controle (PBS) de machos e fêmeas começou com índices próximos do valor normal, com posterior redução após a 2ª dose e aumento após a 3ª e 4ª doses. Observou-se nos machos, um aumento estatisticamente significativo nos grupos C (GLA) e D (Controle), quando se comparou, em ambos, os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a 2ª dose e antes da necropsia. Nas fêmeas também se observou um aumento estatisticamente significativo nos grupos A (Sm14Pp+GLA) e B (Sm14Ec+GLA), quando se comparou, em ambos, os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a 2ª dose e antes da necropsia. Verificou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou a relação albumina/globulina do grupo D (Controle) das fêmeas nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo D (Controle). Quanto aos valores da relação albumina/globulina, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 24 – Níveis séricos de PT



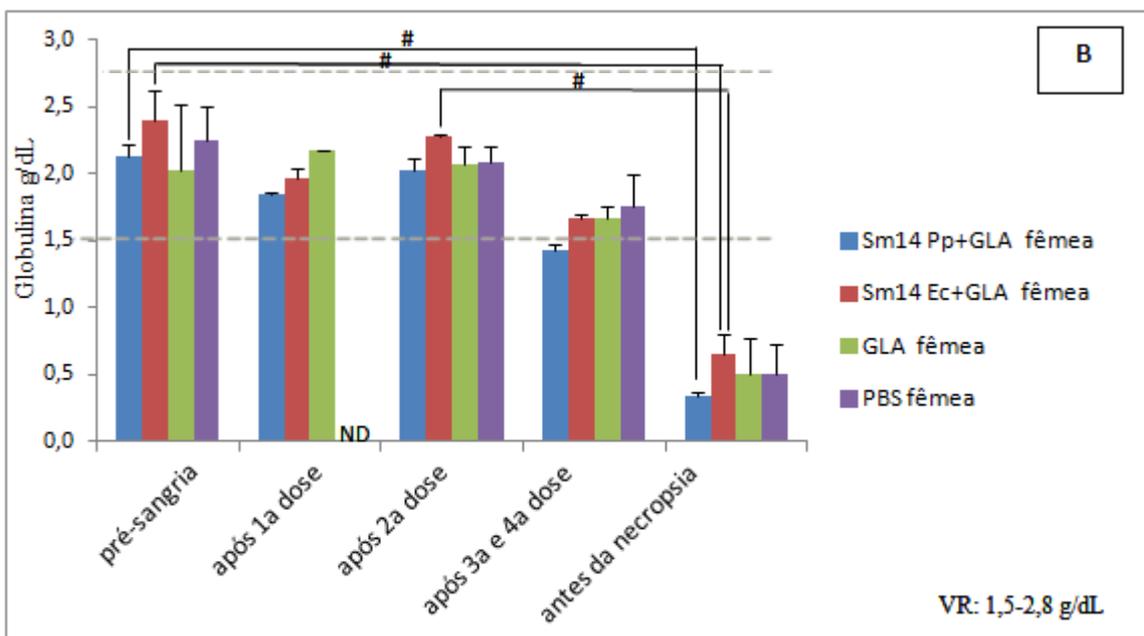
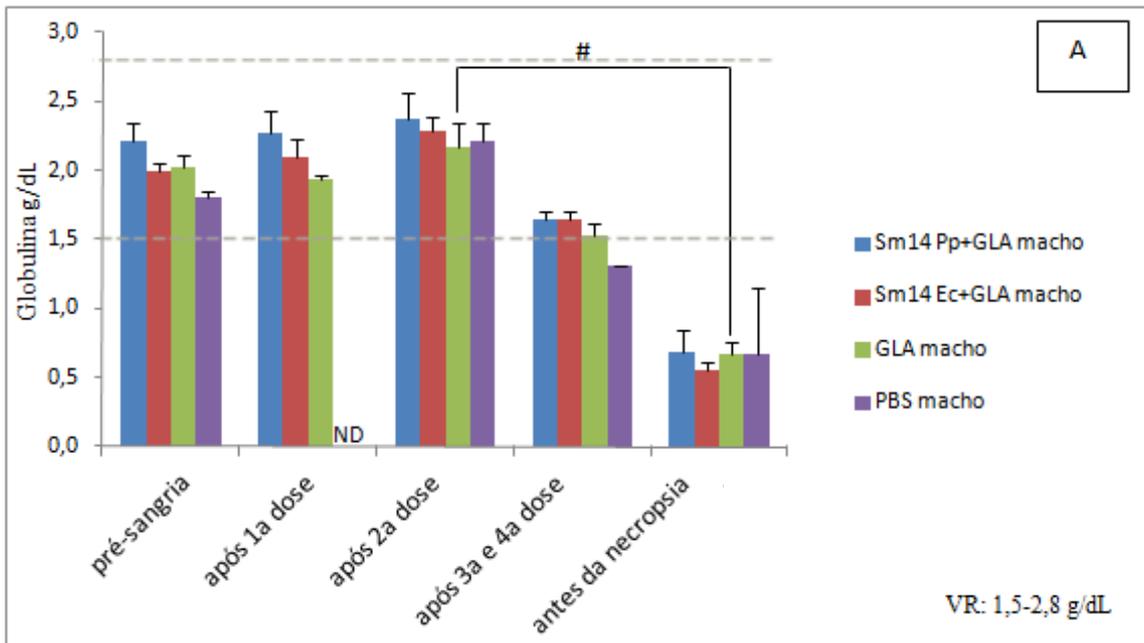
As dosagens dos níveis de proteínas totais em g/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de proteínas totais para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 25 – Níveis séricos de albumina



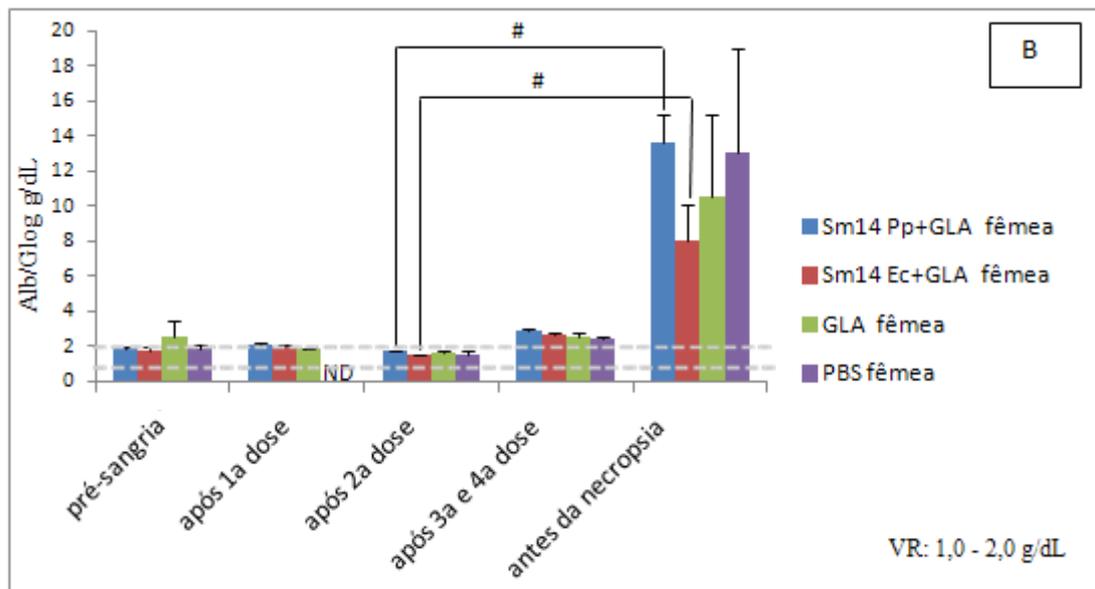
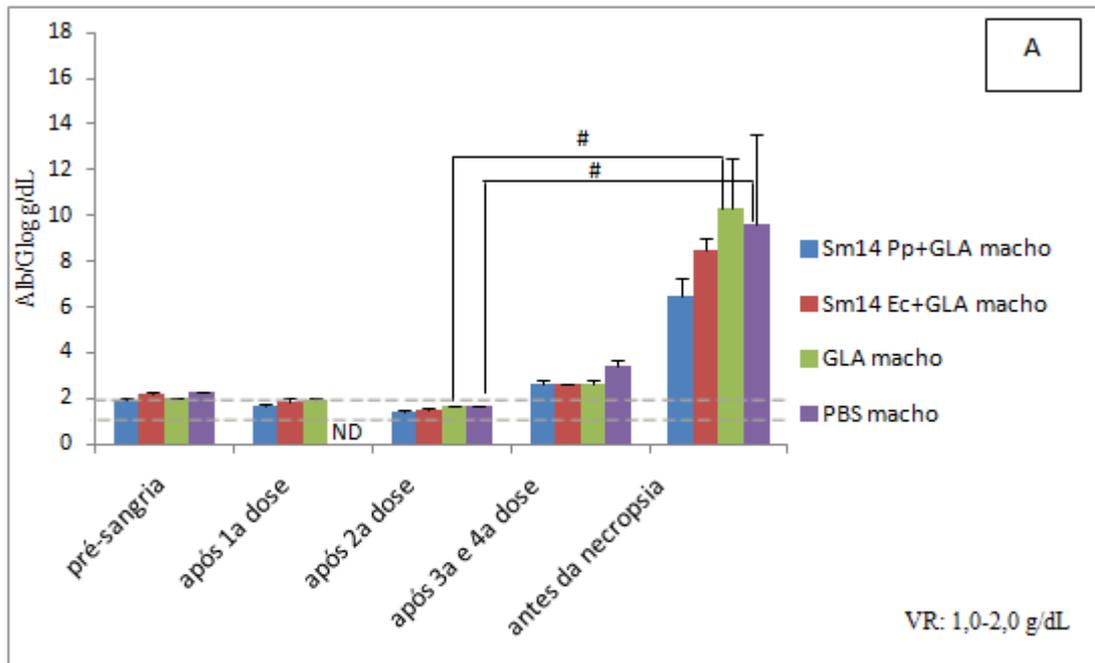
As dosagens dos níveis de albumina em g/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de albumina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 26 – Níveis séricos de globulina



As dosagens dos níveis de globulina em g/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de globulina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 27 – Relação albumina/globulina



A relação albumina/globulina g/dL foi efetuada em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência da relação albumina/globulina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.4.7 Colesterol e triglicerídeos

A determinação plasmática de colesterol total e triglicerídeos é utilizada como recurso de triagem para se pesquisar a hiperlipidemia, um dos fatores condicionantes de arteriosclerose (MILLER; GONÇALVES, 1999). Entretanto, concentrações plasmáticas de colesterol anormalmente baixas podem estar relacionadas com disfunção hepática grave, devido a sua produção ocorrer no fígado (KERR, 2003).

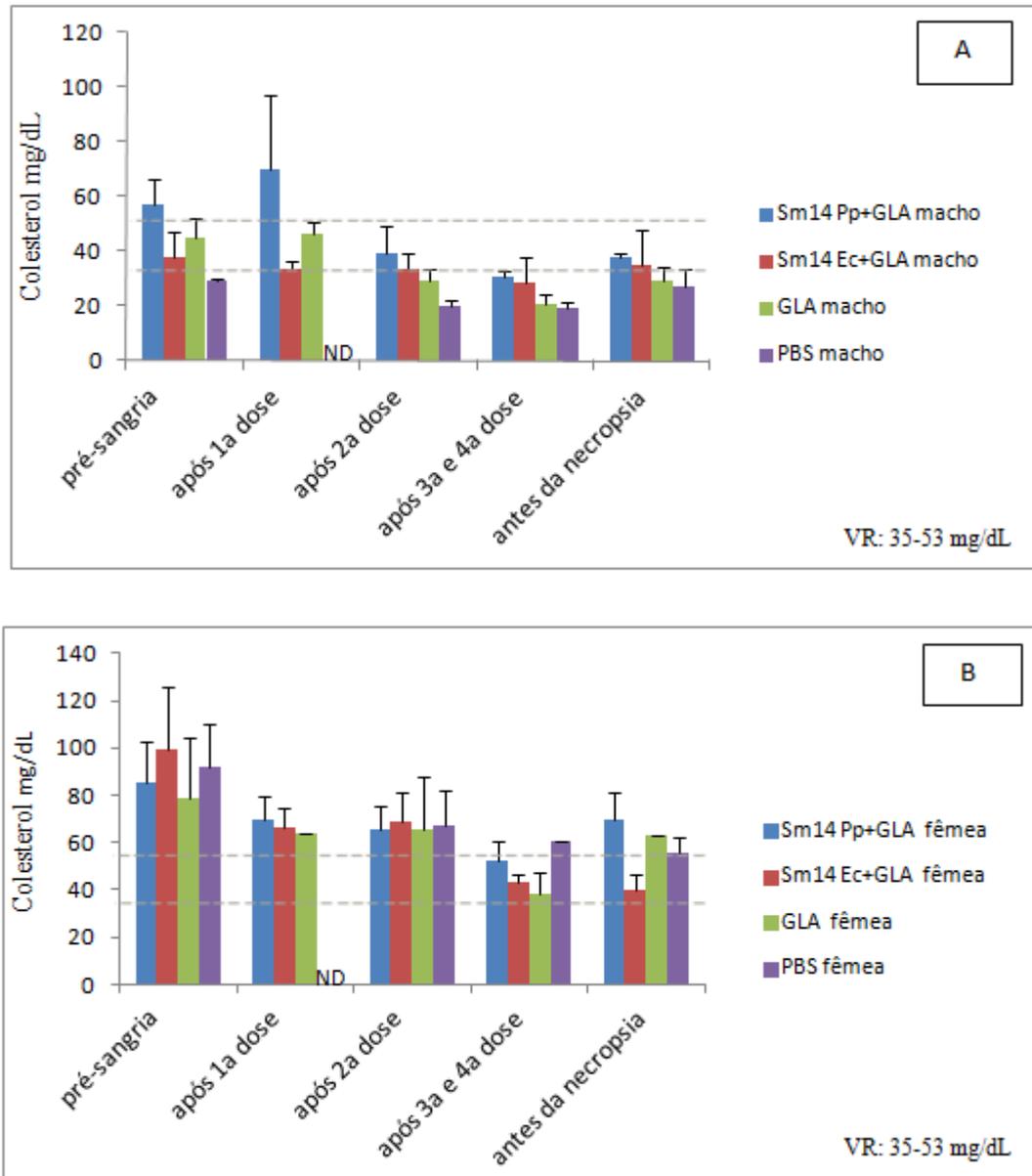
Os machos do grupo A (Sm14 *Pp* + GLA) apresentaram níveis de colesterol superior ao valor normal (valor de referência: 35 – 53 mg/dL) na pré-sangria, aumentando após a 1ª dose, porém ao final do estudo, já apresentavam colesterol dentro dos padrões da normalidade (Figura 28A e B). As fêmeas deste mesmo grupo apresentaram níveis superiores na pré-sangria, porém, embora os níveis de colesterol estivessem diminuindo após os inóculos, ao final do estudo ainda apresentavam colesterol acima do valor normal. Os machos do grupo B (Sm14*Ec* + GLA) apresentaram valores dentro da normalidade na pré-sangria, um decréscimo após a 1ª, 2ª e 4ª doses e a regularização novamente dos níveis de colesterol antes da necropsia. As fêmeas do grupo B (Sm14*Ec* + GLA) apresentaram valores elevados de colesterol na pré-sangria que se normalizaram até o final do estudo. No grupo C (GLA) os machos apresentaram níveis de colesterol normal na pré-sangria e uma diminuição dos níveis até o final do estudo. As fêmeas do grupo C (GLA) começaram e finalizaram o estudo com os níveis de colesterol elevados. O grupo D (PBS/Controle) dos machos apresentou níveis de colesterol inferior em todos os intervalos de tempo, ao contrário do grupo controle das fêmeas que apresentou valores superiores na pré-sangria, uma diminuição após a 2ª dose, porém se mantendo elevado até o final do estudo. Observou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou os níveis de colesterol do grupo B (Sm14 *Ec* + GLA) das fêmeas nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn, utilizado para comparações múltiplas entre os grupos (2 a 2), não mostrou diferença estatística significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo B (Sm14*Ec* + GLA) das fêmeas. Quanto aos níveis de colesterol, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Com relação aos níveis de triglicerídeos, somente no grupo A (Sm14 *Pp*+GLA) dos machos ocorreu um aumento significativo na média (220,0 mg/dl) de triglicerídeos, dado observado após a 1ª dose (Valor de referência: 30 – 141,8 mg/dL), porém, ao final do estudo

se normalizou (Figura 29A). Apenas o grupo B (Sm14 *Ec*+GLA) das fêmeas, no final do estudo, apresentou níveis de triglicerídeos inferior ao valor de referência (Figura 29B).

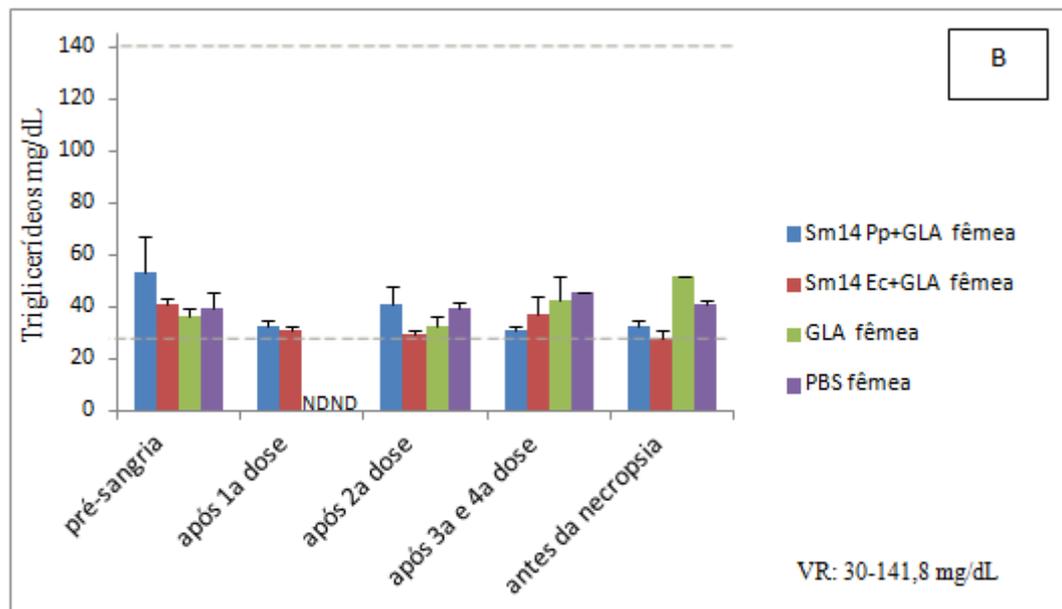
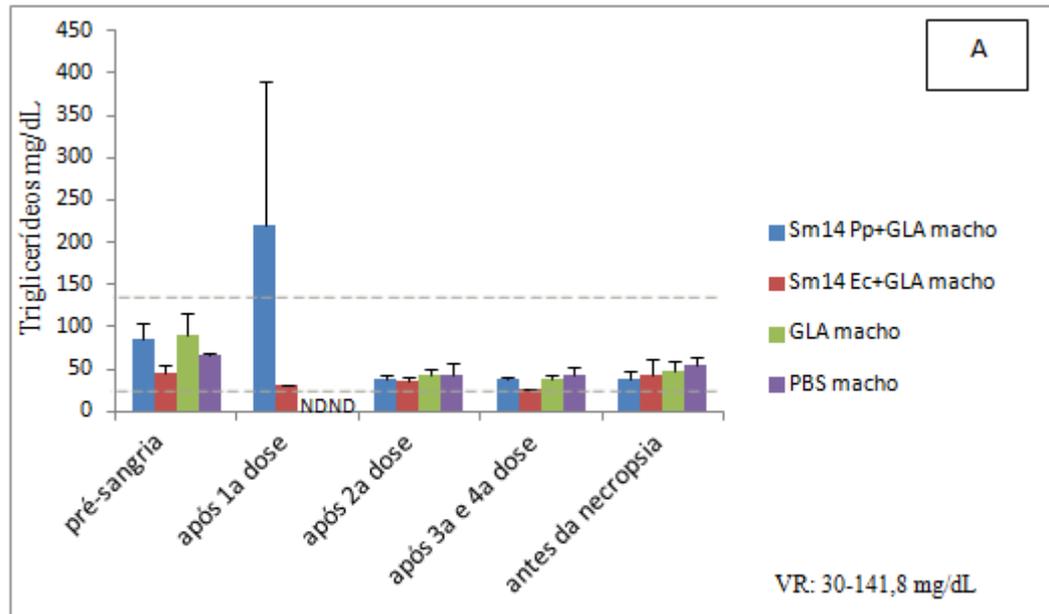
O aumento citado no grupo A se deve ao fato de um dos machos ter apresentado uma dosagem de triglicerídeos, após a 1ª dose, 393% maior do que o padrão máximo aceito no valor de referência, tornando esta amostra, uma variável que alterou o erro-padrão do grupo. Descartando este macho, a média deste grupo seria de 51,0 mg/dl, correspondendo a uma redução de 64% em relação ao valor de referência, portanto não houve diferenças estatísticas entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto aos níveis de triglicerídeos, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

**Figura 28 – Níveis séricos de colesterol**



As dosagens dos níveis de colesterol em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de colesterol para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 29 – Níveis séricos de triglicerídeos



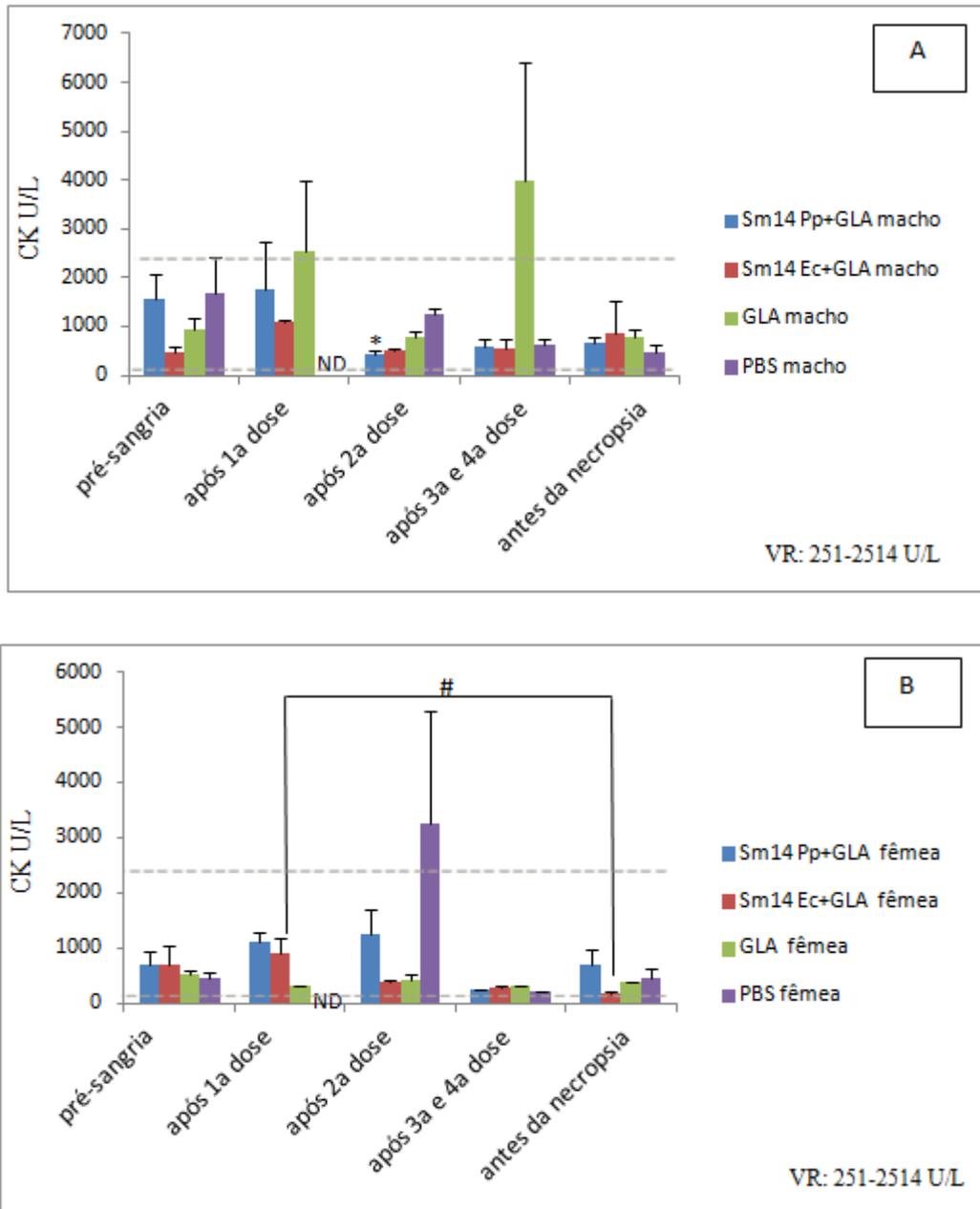
As dosagens dos níveis de triglicerídeos em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de triglicerídeos para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.4.8 Creatinofosfoquinase (CK)

A creatinofosfoquinase (CK) é uma enzima que desempenha importante papel regulador no metabolismo dos tecidos contráteis, sendo útil no diagnóstico do infarto agudo do miocárdio e no acompanhamento de doenças que envolvem os músculos esqueléticos, como miopatias congênitas e adquiridas, hipotireoidismo entre outras (MILLER; GONÇALVES, 1999).

O nível de CK foi substancialmente mais alto a partir da 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> doses nos machos do grupo C (GLA) (valor de referência: 251 – 2514 U/L). Porém, o inverso aconteceu com as fêmeas do Grupo B (Sm14 *Ec*+GLA), com um nível de CK inferior ao valor normal antes da necropsia. Observou-se nos machos um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) entre os grupos A (Sm14Pp + GLA) e D (PBS) logo após a aplicação da segunda dose (Figura 30A). Observou-se que a redução citada nos níveis da creatinofosfoquinase para as fêmeas, foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente para o grupo B (Sm14 *Ec*+GLA) quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos após a inoculação da 1<sup>a</sup> dose e antes da necropsia (Figura 30B). Quanto aos níveis de creatinofosfoquinase, quando se efetuou uma comparação por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa segundo o teste de Dunn quando avaliou-se o grupo Sm14*Ec*+GLA após a 1<sup>a</sup> dose e o grupo PBS após a pré-sangria e a 2<sup>a</sup> dose.

Figura 30 – Níveis séricos de CK



As dosagens dos níveis de CK em U/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de CK para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.4. 9 Transaminase pirúvica (TGP), transaminaseoxaloacética (TGO) e fosfatase alcalina (ALP)

A utilização de dosagens enzimáticas como método auxiliar nos problemas hepáticos é largamente utilizada na medicina veterinária. Os hepatócitos são as células metabolicamente complexas-ativas do fígado, as quais contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas, como transaminase pirúvica (TGP), transaminaseoxaloacética (TGO) e fosfatase alcalina (ALP). Estas enzimas são úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. Elas são os principais marcadores de lesão celular, especialmente nas hepatopatias, apesar de poderem também estar aumentadas em outros órgãos (HENRY, 2008).

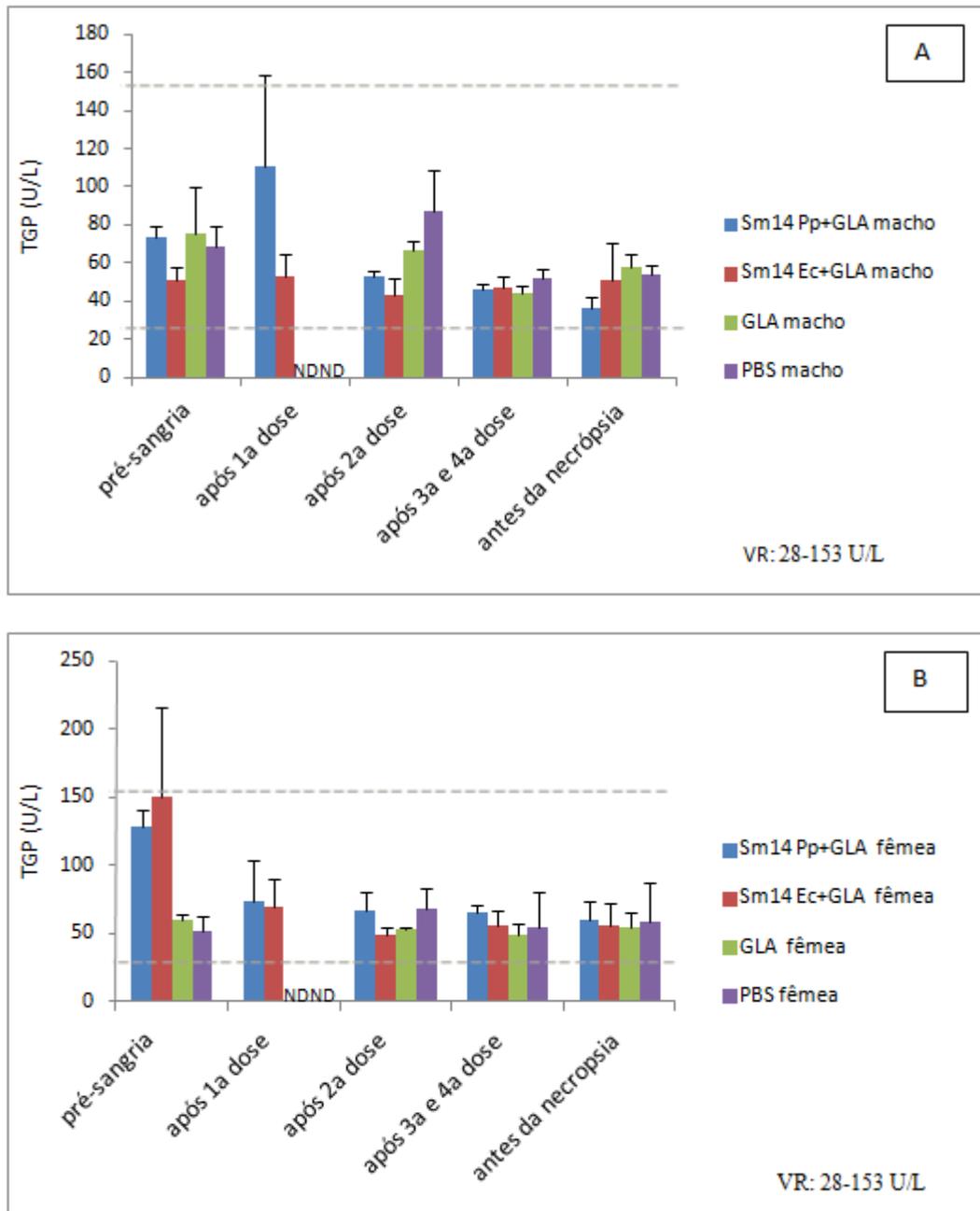
Todos os animais apresentaram concentrações de TGP dentro do limite da normalidade (Figura 31A e B). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quando se efetuou uma comparação entre os sexos, encontrou-se diferença estatística significativa segundo o teste t student não pareado quando avaliou-se o grupo Sm14Pp+GLA no período da pré-sangria.

Com relação aos níveis de TGO, todos os animais apresentaram concentrações dentro do limite da normalidade (valor de referência: 13,0 – 184,0 U/L), (Figura 32A e B). Observou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), quando se comparou nos machos os níveis de TGO entre os grupos de estudo do período referente à 2ª dose. Porém, o teste de Dunn, utilizado para comparações múltiplas entre os grupos (2 a 2), não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os grupos de estudo do período referente à 2ª dose. Quanto aos níveis de TGO, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Todos os grupos iniciaram o estudo com níveis de fosfatase alcalina (ALP) dentro da normalidade (valor de referência: 90 - 145 U/L). Entretanto, no grupo A (Sm14 Pp + GLA) tanto dos machos quanto das fêmeas ocorreu um decréscimo dos níveis de ALP desde a 1ª dose até o final do estudo, apresentando valores abaixo dos índices da normalidade (Figura 33A e B). No grupo B (Sm14 Ec + GLA) dos machos ocorreu uma diminuição dos níveis de ALP após a 2ª, 3ª e 4ª doses, normalizando-se até o final do estudo (antes da necropsia). Já nas fêmeas deste mesmo grupo, os níveis de ALP começaram a diminuir após a 1ª dose, mantendo-se com valor inferior até o final do estudo. Os machos e as fêmeas do grupo C (GLA) também apresentaram diminuição dos níveis de ALP após a 1ª dose, entretanto,

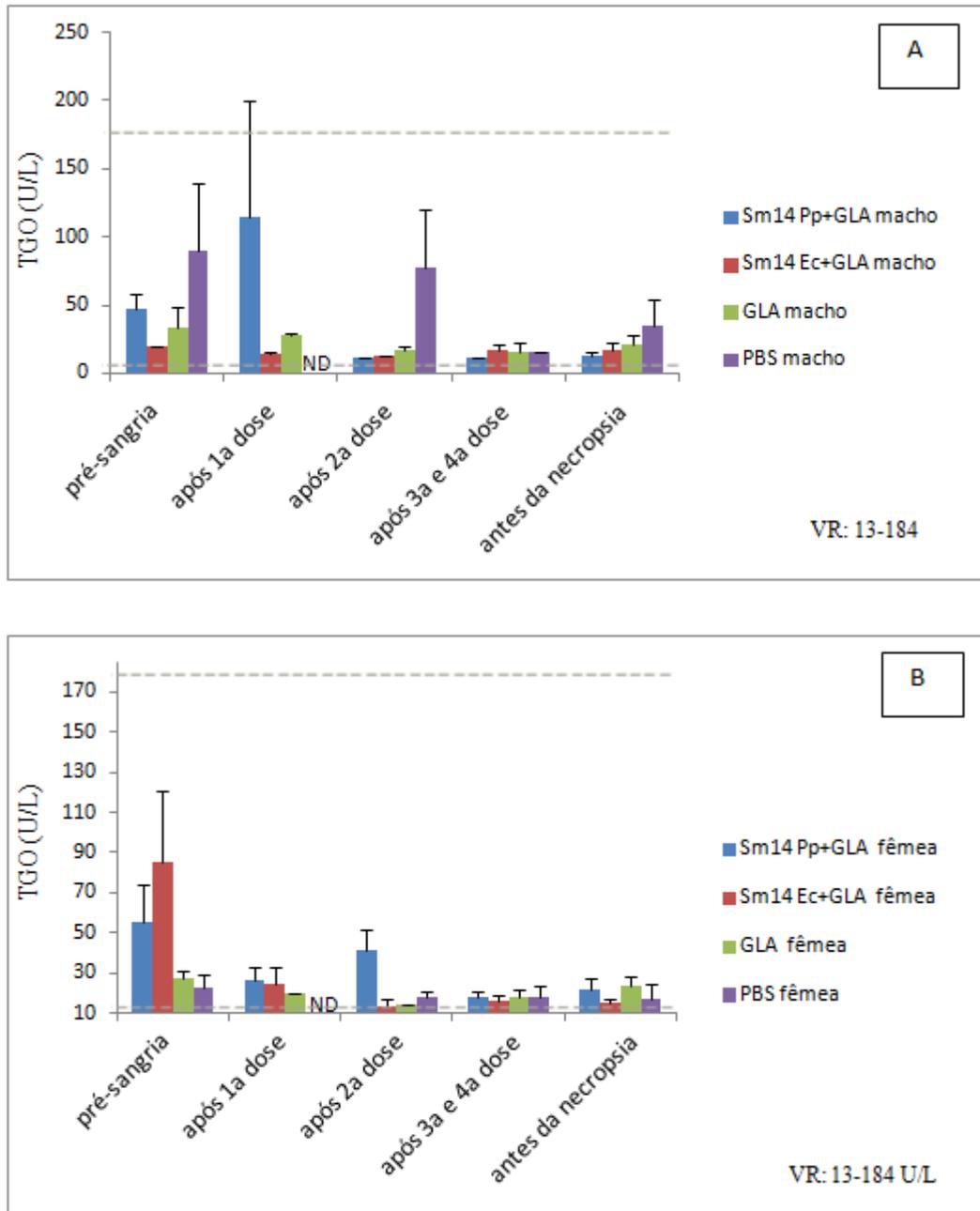
somente os machos no final do estudo (antes da necropsia) apresentaram níveis de ALP dentro do limite normal. No grupo controle dos machos ocorreu uma diminuição dos níveis de ALP após a 4ª dose, permanecendo abaixo do valor de referência até o final do estudo. O grupo D (PBS/controle) das fêmeas iniciou e terminou o estudo com níveis de ALP dentro da normalidade, embora, após a 2ª 3ª e 4ª doses tenha ocorrido um aumento desta enzima acima do limite normal. Observou-se que a redução citada nos níveis da enzima foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente no grupo C dos machos e nos grupos A e B das fêmeas, quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes à pré-sangria e após a aplicação da 4ª dose. Quanto aos níveis de fosfatase alcalina, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 31 – Níveis séricos de TGP



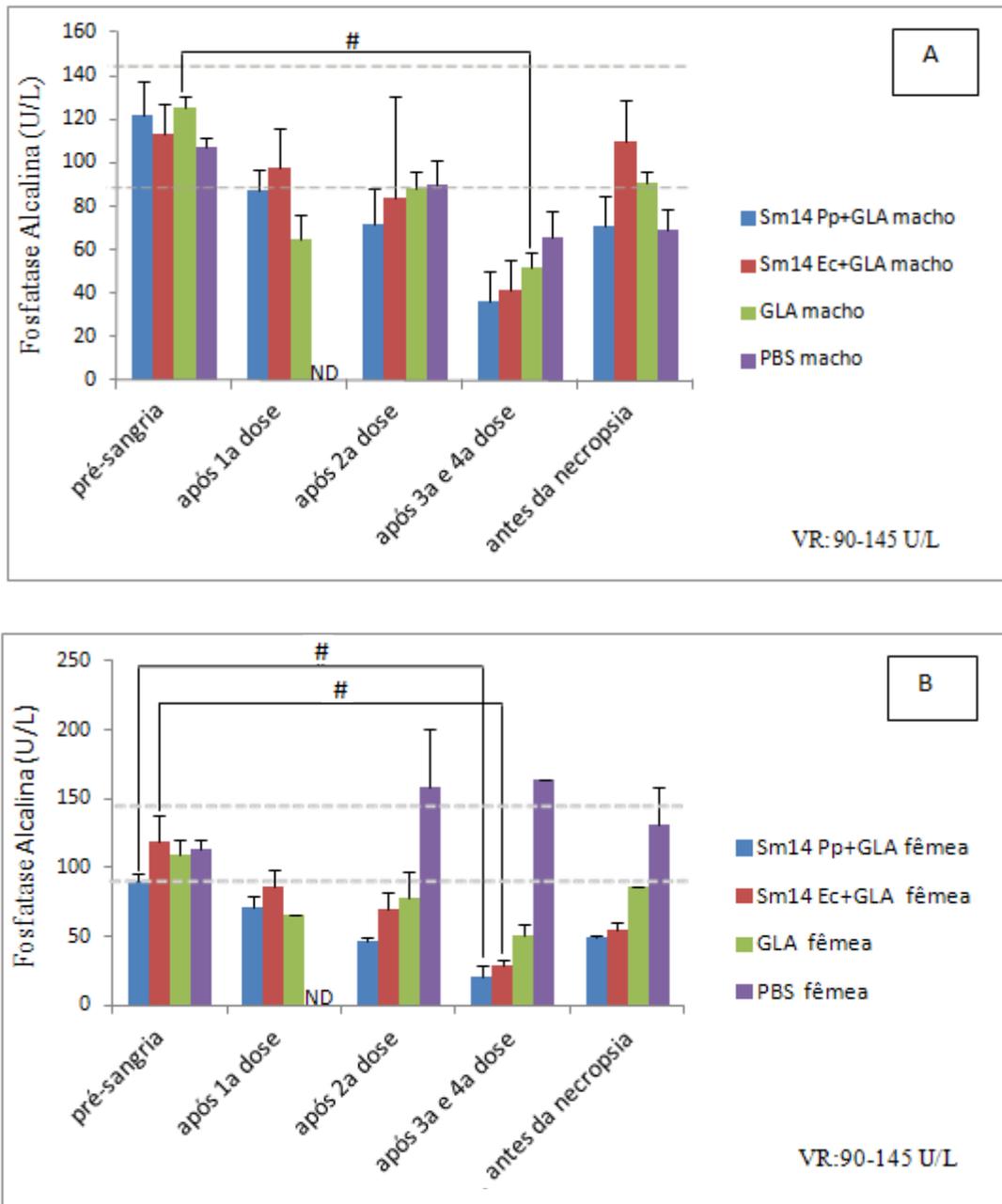
As dosagens dos níveis de TGP em U/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de TGP para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 32 – Níveis séricos de TGO



As dosagens dos níveis de TGO em U/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de TGO para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 33 – Níveis séricos de fosfatase alcalina



As dosagens dos níveis de fosfatase alcalina em U/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de fosfatase alcalina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

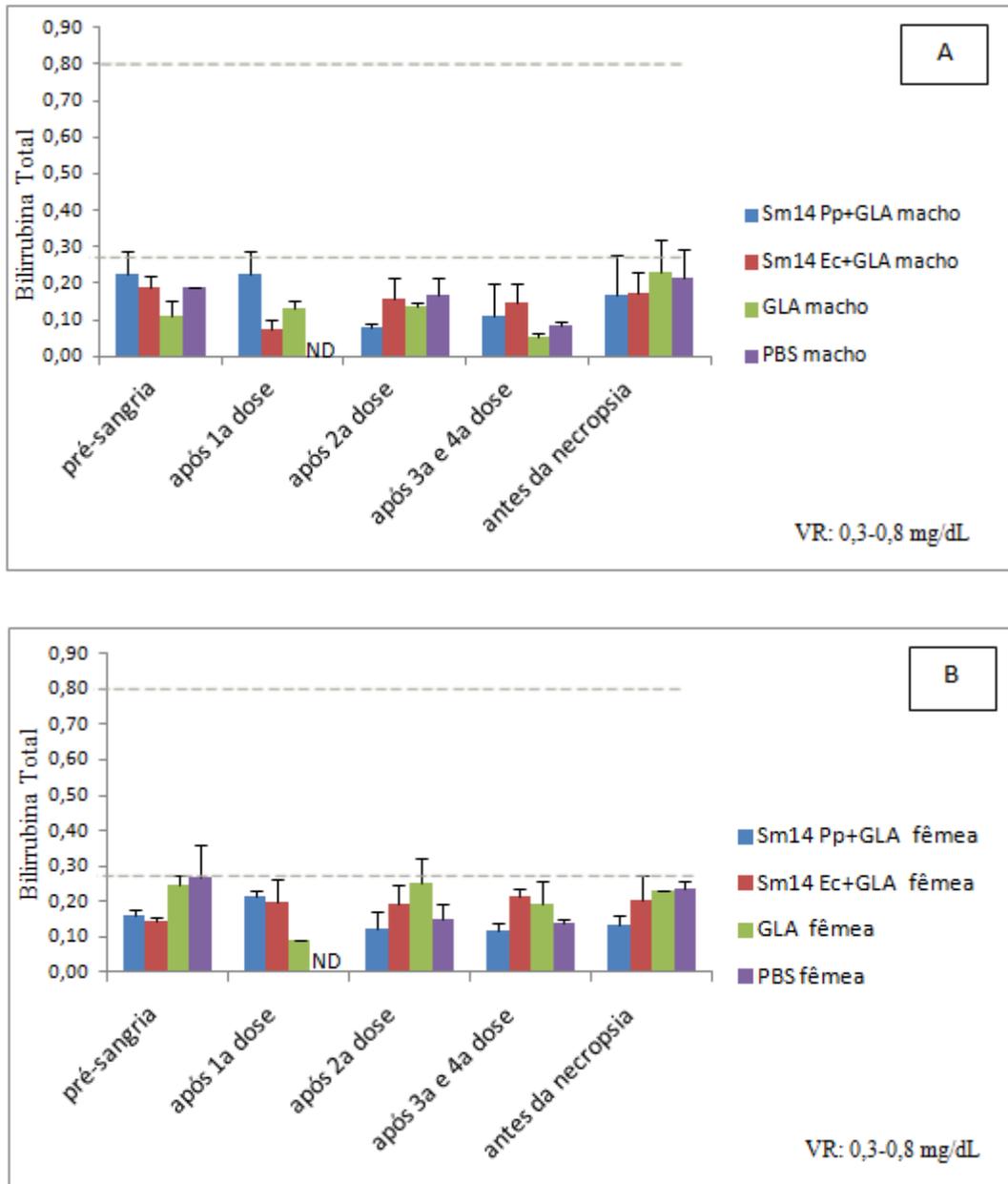
#### 5.4.10 Bilirrubina total

A determinação da bilirrubina total sérica constitui um recurso também muito utilizado na avaliação das hepatopatias, entretanto seus níveis podem também estar elevados em várias outras doenças, sendo as mais comuns as hemoglobinopatias (MILLER; GONÇALVES, 1999).

A média dos valores da bilirrubina total foi baixa em todos os grupos, inclusive antes da vacinação (Figura 34A e B). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo tanto para machos, quanto para fêmeas. Quanto aos níveis de bilirrubina total, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

O Quadro 2 sumariza os resultados das análises bioquímicas em relação ao controle e temporal.

Figura 34 – Níveis séricos de bilirrubina total



As dosagens dos níveis de bilirrubina total em mg/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de bilirrubina total para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Quadro 2 – Resumo dos resultados bioquímicos em relação ao controle e tempo

| Parâmetros                 | Grupos Experimentais |   |             |     |     |   |
|----------------------------|----------------------|---|-------------|-----|-----|---|
|                            | Sm14Pp +GLA          |   | Sm14Ec +GLA |     | GLA |   |
|                            | M                    | F | M           | F   | M   | F |
| Uréia                      | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Creatinina                 | —                    | — | —           | —   | f,i | — |
| Amilase                    | —                    | — | a           | a   | ↑   | — |
| Glicose                    | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Cálcio                     | —                    | e | —           | ↓   | —   | — |
| Fósforo                    | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Cloro                      | —                    | — | —           | i   | i   | — |
| Potássio                   | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Sódio                      | e                    | — | d           | —   | —   | — |
| Proteínas Totais           | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Albumina                   | —                    | g | g           | g   | —   | — |
| Globulina                  | —                    | c | —           | c,g | g   | — |
| Relação Albumina/Globulina | —                    | g | —           | g   | g   | — |
| Colesterol                 | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Triglicerídeos             | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Creatinofosfoquinase       | ↑                    | — | —           | e   | —   | — |
| Transaminase Pirúvica      | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Transaminase oxaloacética  | —                    | — | —           | —   | —   | — |
| Fosfatase Alcalina         | —                    | b | —           | b   | b   | — |
| Bilirrubina Total          | —                    | — | —           | —   | —   | — |

↑: aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle pós pré-sangria. ↓: redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle pós pré-sangria. ↑: aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle pós 2ª dose. —: ausência de diferença estatística significativa em relação ao controle. **a**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e pós 2ª dose; **b**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e pós 4ª dose; **c**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e antes da necropsia; **d**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 1ª dose e pós 2ª dose; **e**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 1ª dose e antes da necropsia; **f**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 2ª dose e pós 4ª dose; **g**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 2ª dose e antes da necropsia; **i**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 4ª dose e antes da necropsia.

## 5.5 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

O hemograma é utilizado como procedimento de triagem para avaliar a saúde do animal, na busca do diagnóstico ou prognóstico, e ainda para verificar a habilidade corporal às infecções e para monitoramento do progresso de certas doenças (MILLER; GONÇALVES, 1999).

### 5.5.1 Contagem de hemácias e hemoglobina

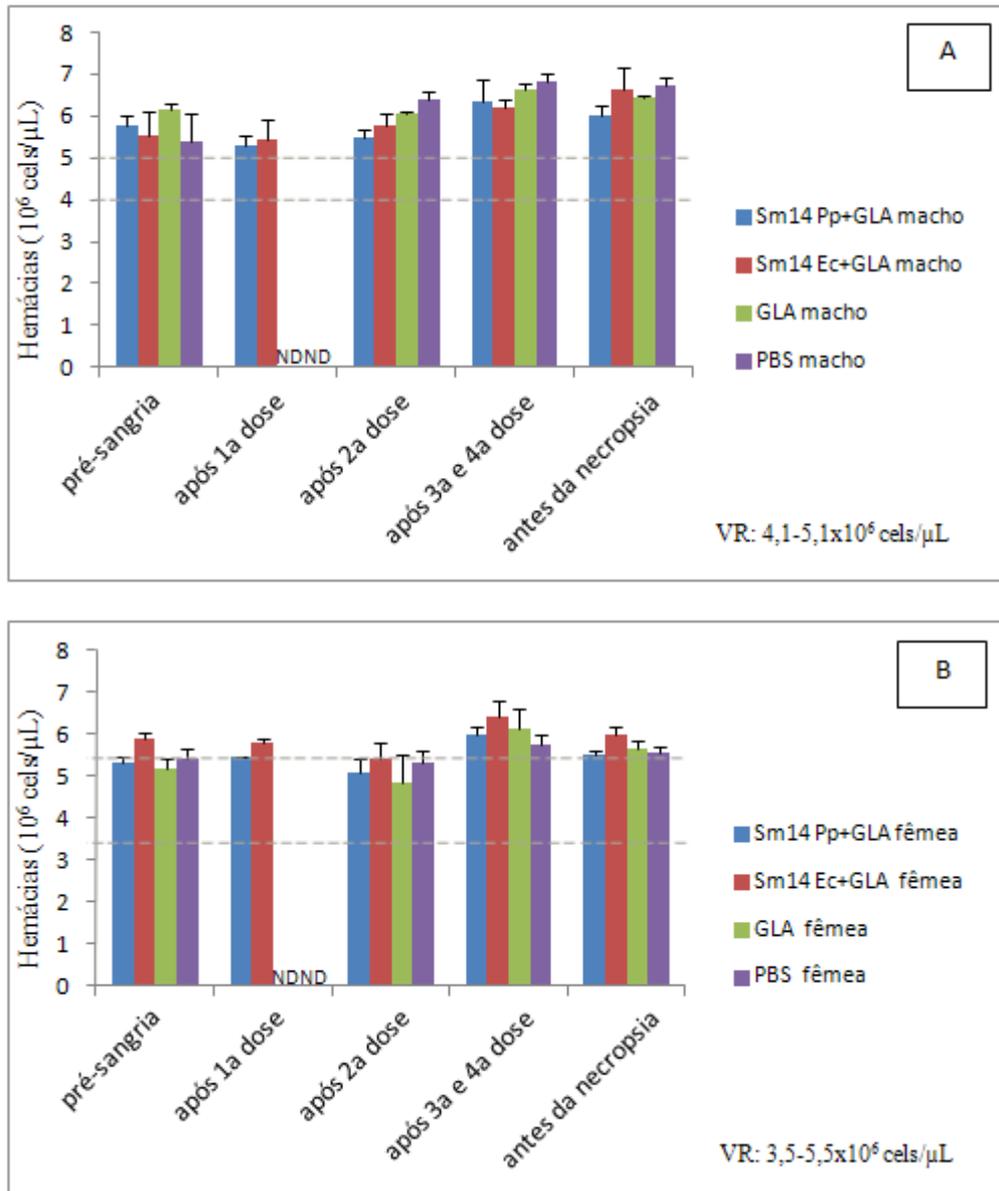
A diminuição do número de hemácias no sangue circulante, a diminuição do teor de hemoglobina nas hemácias ou ambos os fenômenos associados caracterizam um quadro de anemia. Carência de fatores hematopoéticos, falta ou depressão do tecido hematopoiético, perda de sangue (anemia hemorrágica) e destruição excessiva de hemácias (anemia hemolítica) são as principais causas da anemia (MILLER; GONÇALVES, 1999).

As variações no tempo da contagem de hemácias têm configuração semelhante em todos os grupos dos machos, apresentando contagem acima do limite normal desde a pré-sangria (Figura 35A). No grupo B (Sm14 *Ec* +GLA) das fêmeas, embora a contagem de hemácias tenha atingido uma faixa normal após a 2ª dose, ocorreu um aumento após a 3ª e 4ª doses, mantendo a mesma elevada até antes da necropsia (Figura 35B). Os grupos A (Sm14 *Pp* +GLA), C (GLA) e D (Controle) das fêmeas, embora tenham iniciado o estudo com contagem de hemácias dentro do limite normal, apresentaram um aumento após a 3ª e 4ª doses, mantendo-se elevada até o final do estudo no grupo C e dentro do limite normal nos grupos A e D (Figura 35B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada intervalo de tempo analisado e em cada grupo analisado nos diferentes intervalos de tempo. Quanto a contagem de hemácias, quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo GLA na pré-sangria, o grupo PBS após a 2ª e 4ª dose e os grupos GLA e PBS antes da necropsia, segundo o teste t-student não pareado.

Em todos os grupos dos machos, os níveis médios de hemoglobina se mostram aumentados desde a pré-sangria (Figura36A), com valores ainda mais elevados ao final do estudo. Somente as fêmeas do grupo B -Sm14 *Ec* +GLA- (Figura 36B) apresentaram níveis de hemoglobina elevados na pré-sangria, porém, uma normalização dos níveis ocorreu após a 1ª e 2ª doses. Entretanto, no final do estudo os níveis se encontravam acima do limite normal. Nos demais grupos das fêmeas, houve um aumento dos níveis de hemoglobina somente após

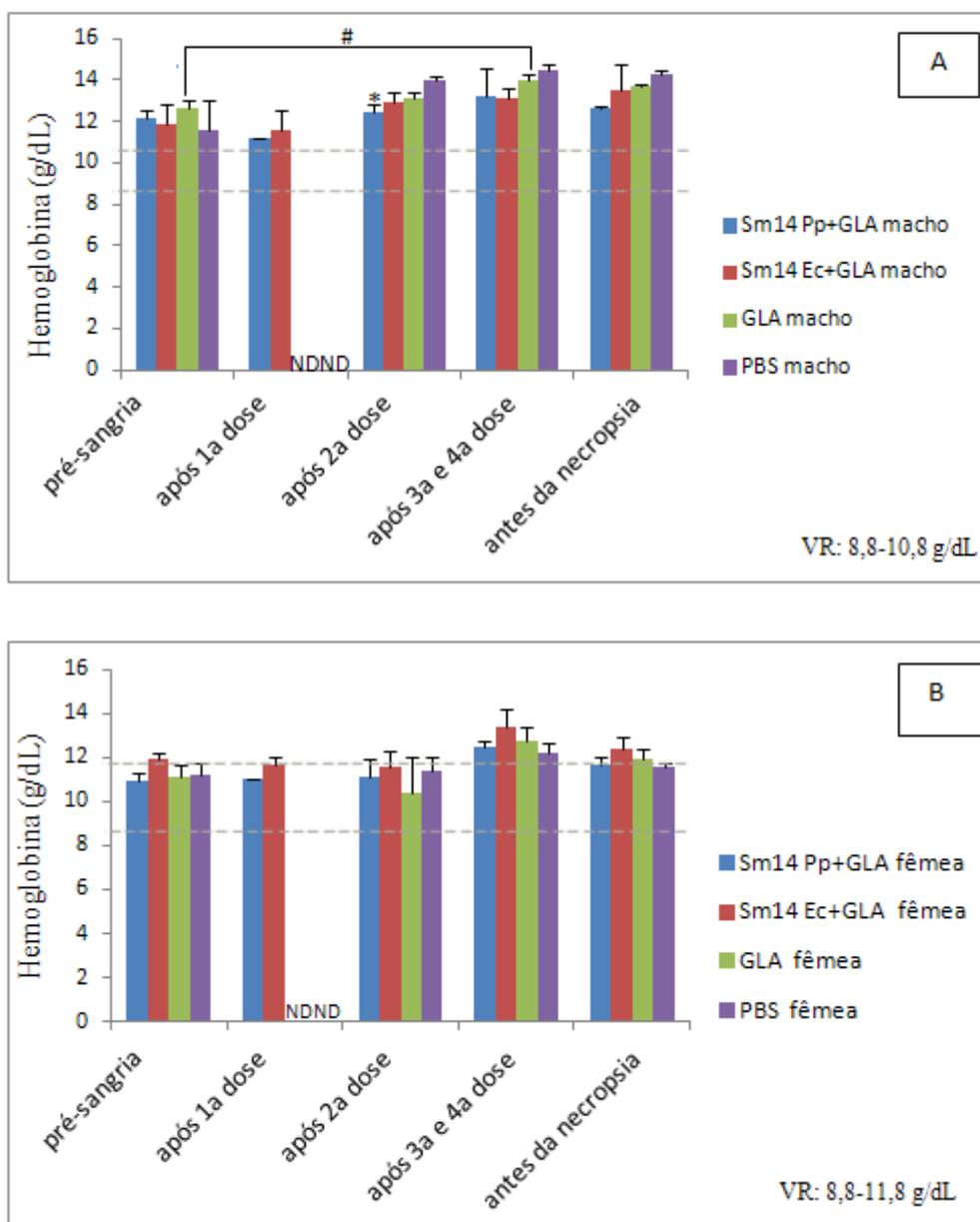
a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> doses, com normalização dos níveis nos grupos A (Sm14 Pp +GLA) e D (PBS/controle) ao final do estudo (Figura 36B). Observou-se nos machos um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da hemoglobina entre os grupos A (Sm14Pp + GLA ) e D (PBS) após a 2<sup>a</sup> dose e no grupo C (GLA), quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos da pré-sangria e após a 4<sup>a</sup> dose (Figura 36A). Quanto aos níveis médios de hemoglobina, quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo GLA antes da necropsia, o grupo PBS após a 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> dose e antes da necropsia, segundo o teste t-student não pareado.

Figura 35 – Contagem de hemácias



As contagens de hemácias em  $10^6$  x cels/ $\mu$ L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de hemácias para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 36 – Níveis de hemoglobina



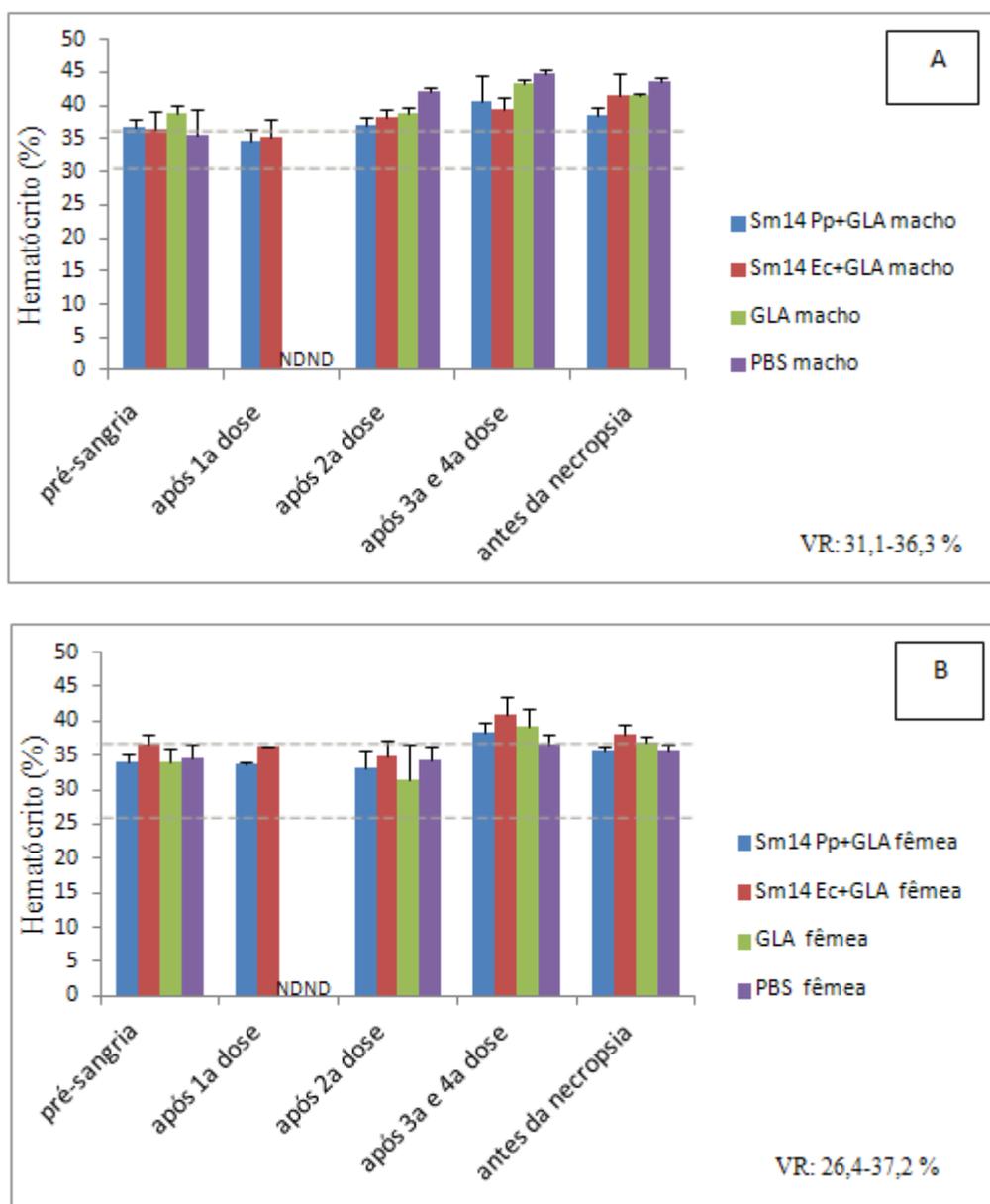
As dosagens dos níveis de hemoglobina em g/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de hemoglobina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

### 5.5.2 Hematócrito

O valor do hematócrito ou volume globular reflete a massa total de células sanguíneas na unidade de volume. O valor do hematócrito estará baixo em todas as anemias. Sua elevação acima da normalidade pode depender do aumento do número de hemácias ou da diminuição do volume plasmático, como ocorre nas desidratações, no choque e nas queimaduras (MILLER; GONÇALVES, 1999).

As variações encontradas nos níveis de hematócrito são coerentes com as observadas nas contagens de hemácia e hemoglobina tanto nos grupos dos machos, com valores acima das cifras normais, até o final do estudo, quanto nas fêmeas, onde o grupo B (Sm14 *Ec* + GLA) também termina o estudo com níveis acima do normal (Figura 37A e B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto aos níveis de hematócrito, quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo GLA antes da necropsia, o grupo PBS após a 2ª e 4ª dose e antes da necropsia, segundo o teste t-student não pareado.

Figura 37 – Níveis de hematócrito



As dosagens dos níveis de hematócrito em % foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência do hematócrito para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

### 5.5.3 Volume corpuscular Médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC)

Os índices hematimétricos são extremamente úteis na avaliação e classificação morfológica das anemias. O VCM é um importante índice na medida em que sua determinação orienta o diagnóstico das anemias, classificando-as em microcíticas, normocíticas e macrocíticas. O MCH, parâmetro que reflete a quantidade média de hemoglobina de cada hemácia, estará aumentado na macrocitose (aumento do tamanho das hemácias) e reduzido na microcitose (diminuição do tamanho das hemácias). O MCHC é um parâmetro que estima a concentração média de hemoglobina pelo número de eritrócitos do animal. As principais causas relatadas de aumento de MCHC são em casos de esferocitose, hemólise intra-vascular e lipemia. Anemia envolvendo deficiência de ferro e anemias regenerativas podem promover diminuição do MCHC. (MILLER; GONÇALVES, 1999).

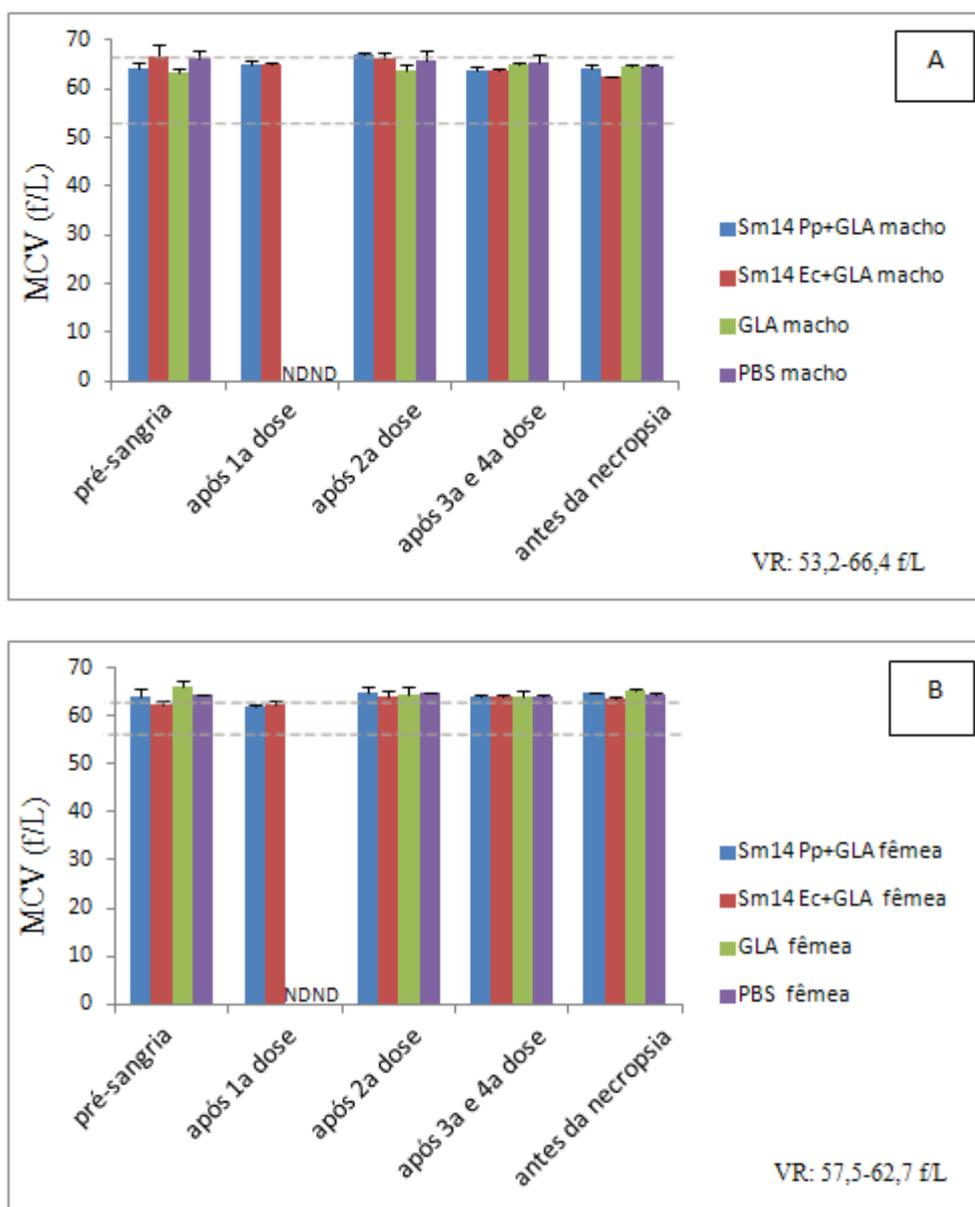
Todos os machos apresentaram concentrações de MCV dentro do limite da normalidade até o final do estudo (Figura 38A). As fêmeas dos grupos A (Sm14Pp+GLA), C (GLA) e D (Controle) apresentaram índices acima do limite normal já na pré-sangria, se mantendo elevado até o final do estudo (Figura 38B). Houve um aumento de MCV no grupo B das fêmeas somente a partir da 2ª dose que se manteve também até o final do estudo. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto aos níveis de hematócrito, quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo Sm14Pp+GLA após a 1ª dose e o grupo Sm14Ec+GLA antes da necropsia, segundo o teste t-student não pareado.

A maioria dos machos e todas as fêmeas apresentaram hemoglobina corpuscular média (MCH) dentro do limite da normalidade (Figura 39A e B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto aos níveis de hemoglobina corpuscular média, quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo controle (PBS) na pré-sangria, segundo o teste t-student não pareado.

Todos os machos e a maioria das fêmeas apresentaram concentrações de MCHC dentro do limite da normalidade (Figura 40A e B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto a concentração média de

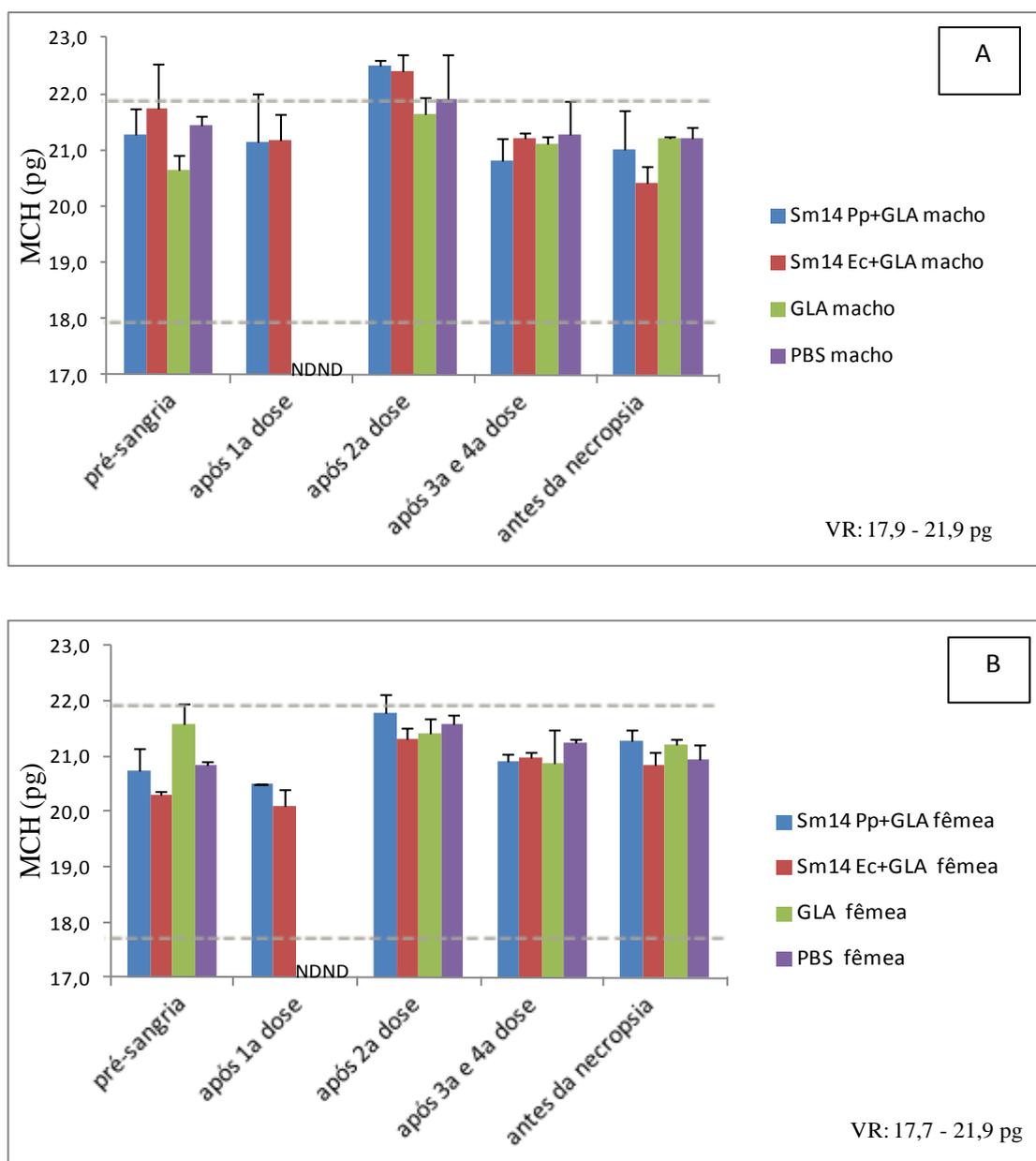
hemoglobina, quando comparou-se por sexo, também não se observou diferença estatística significativa, segundo o teste t-student não pareado.

Figura 38 – Níveis de MCV



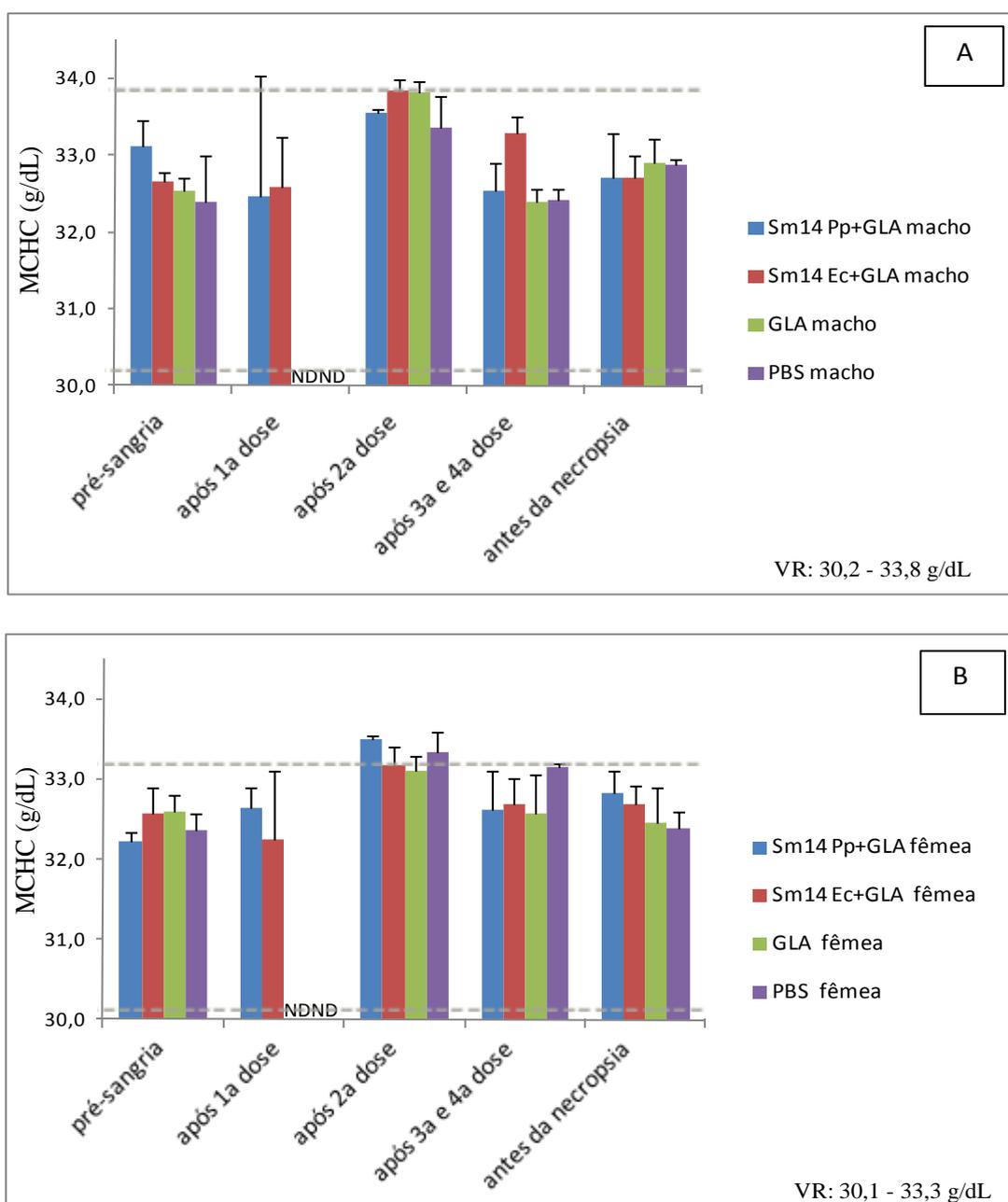
As dosagens dos níveis de MCV em f/L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência do MCV para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 39 – Níveis de MCH



As dosagens dos níveis de MCH em pg foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência do MCH para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 40 – Níveis de MCHC



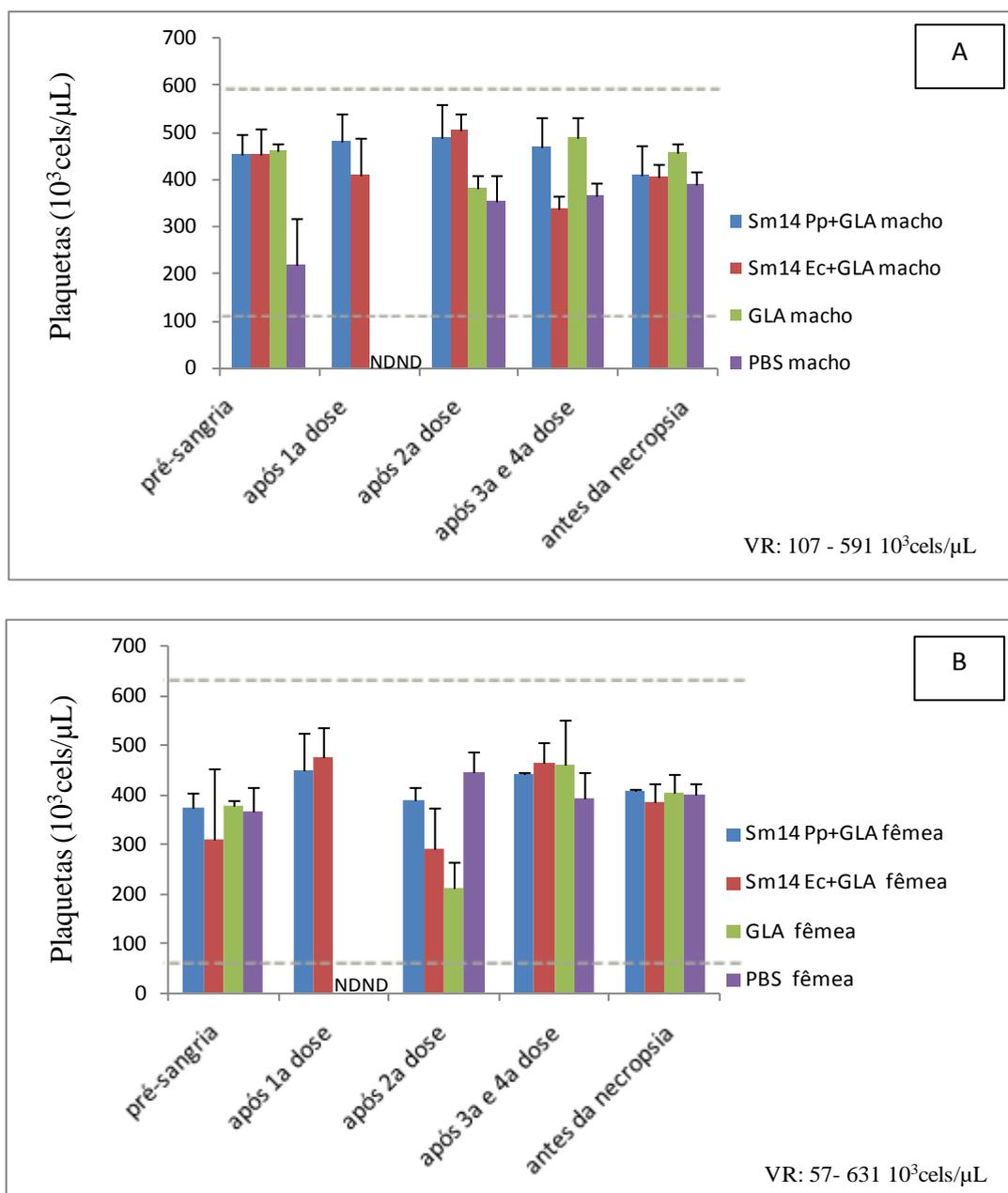
As dosagens dos níveis de MCHC em g/dL foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência do MCHC para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

#### 5.5.4 Plaquetas

As plaquetas apresentam como função primária a manutenção da hemostasia. A contagem de plaquetas é um parâmetro muito útil em estudo pré-clínicos de toxicidade, pois muitos agentes químicos, como medicamentos, podem promover a redução do número de plaquetas (plaquetopenia) (LATIMER; MAHAFFEY; PRASSE, 2003).

Todos os animais apresentaram plaquetas dentro do limite da normalidade (Figura 41A e B). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quanto aos níveis de plaqueta quando comparou-se por sexo, encontrou-se diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo C (GLA) na pré-sangria, segundo o teste t-student não pareado.

Figura 41 – Níveis de Plaquetas



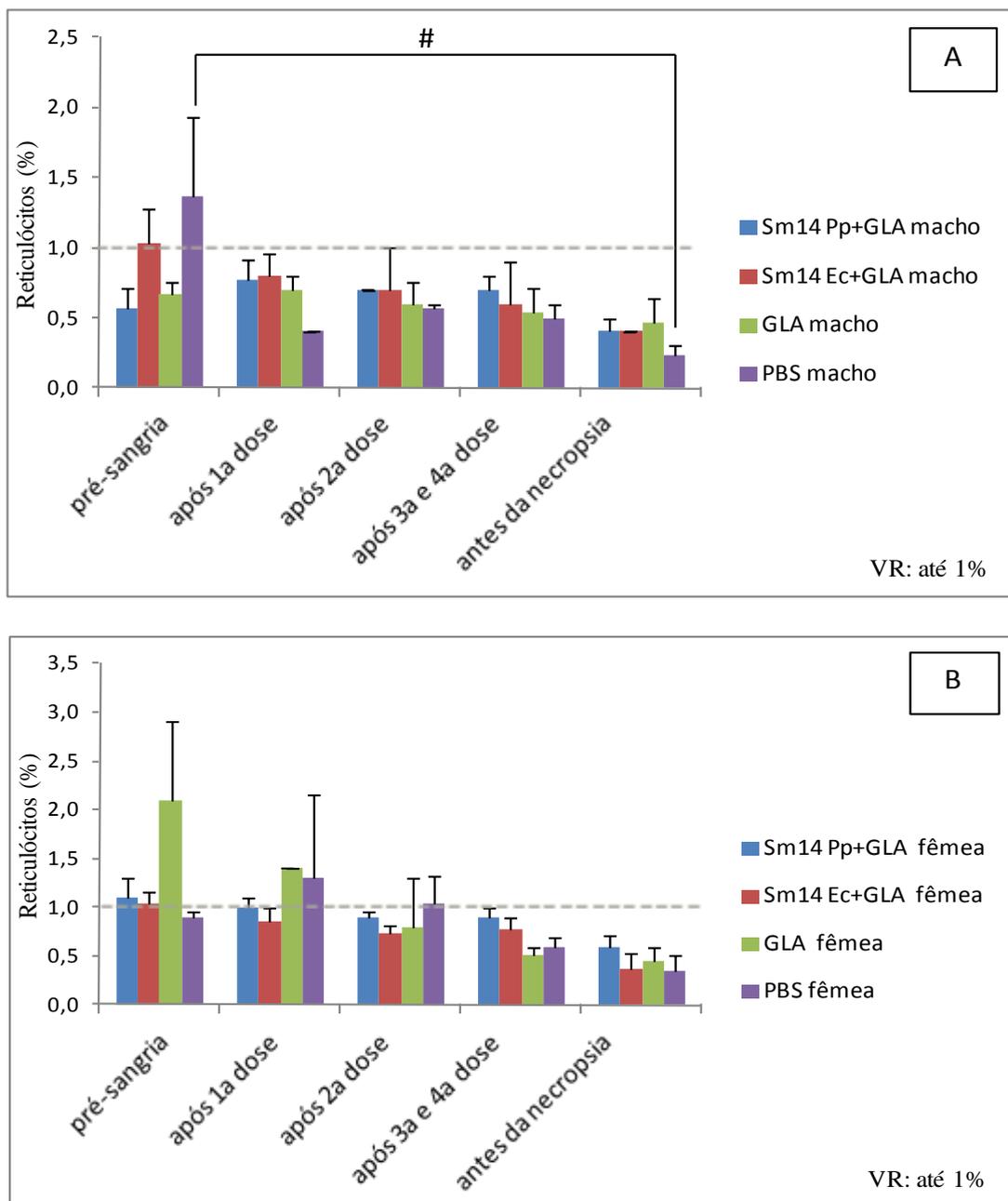
As dosagens dos níveis de plaquetas em cels/ $\mu$ L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1<sup>a</sup> dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de plaquetas para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

### 5.5.5 Reticulócitos

A determinação da taxa de reticulócitos é utilizada para avaliar de forma efetiva a produção de hemácias, no diagnóstico diferencial e na classificação das anemias (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Somente os machos do grupo D (Controle/PBS) e as fêmeas dos grupos A (Sm14 + GLA) e C (GLA) apresentaram número de reticulócitos acima do valor de referência (até 1%) no início do estudo (pré-sangria), porém, houve uma normalização dos reticulócitos até o final do estudo (Figura 42A e B). Observou-se diferença estatística significativa apenas entre os machos do grupo D (Controle/PBS) quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes a pré-sangria e antes da necropsia. Quanto aos números de reticulócitos, quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Figura 42 – Níveis de Reticulócitos



As dosagens dos níveis de reticulócitos em  $/\text{mm}^3$  foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de reticulócitos para coelhos.

### 5.5.6 Leucócitos (WBC- white blood cells), linfócitos e neutrófilos

O leucograma constitui um valioso subsídio ao diagnóstico etiológico de numerosos estados infecciosos e inflamatórios agudos e crônicos. A alteração leucocitária pode ser fisiológica, patológica ou como resultado de uma alteração neoplásica. De maneira geral, encontra-se leucocitose neutrófila nas infecções piogênicas, nas necroses tissulares maciças e em algumas infecções por vírus. Em situações de estresse pode ocorrer linfopenia associada a neutrofilia, ocorre também leucopenia nas infecções virais (fase aguda). A linfocitose absoluta é encontrada em infecções crônicas, particularmente nas infecções que demandam uma resposta humoral (NELSON; COUTO, 2006).

Somente o grupo D (PBS/controle) dos machos apresentou números de leucócitos dentro da normalidade até o final do estudo (Figura 43A). O grupo A (Sm14 *Pp* + GLA) das fêmeas apresentou o número de leucócitos dentro da faixa de referência ( $2.400 - 4.600 \times 10^3$  cels/ $\mu$ l) na pré-sangria. Porém, assim como nos demais grupos, ao final do estudo, a contagem de leucócitos do grupo A estava acima do limite normal (Figura 43B). Observou-se nos machos uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem de leucócitos entre os grupos B (Sm14*Ec* + GLA ) e D (PBS/Controle) após a 2ª dose, e no grupo B (Sm14*Ec* +GLA) após a 2ª dose em relação aos demais intervalos. Quando comparou-se por sexo, houve diferença estatística significativa quando avaliou-se o grupo Sm14*Pp*+GLA na pré-sangria, após 2ª dose e antes da necropsia, no grupo Sm14*Ec*+GLA após 2ª dose e no grupo GLA antes da necropsia, segundo o teste t-student não pareado.

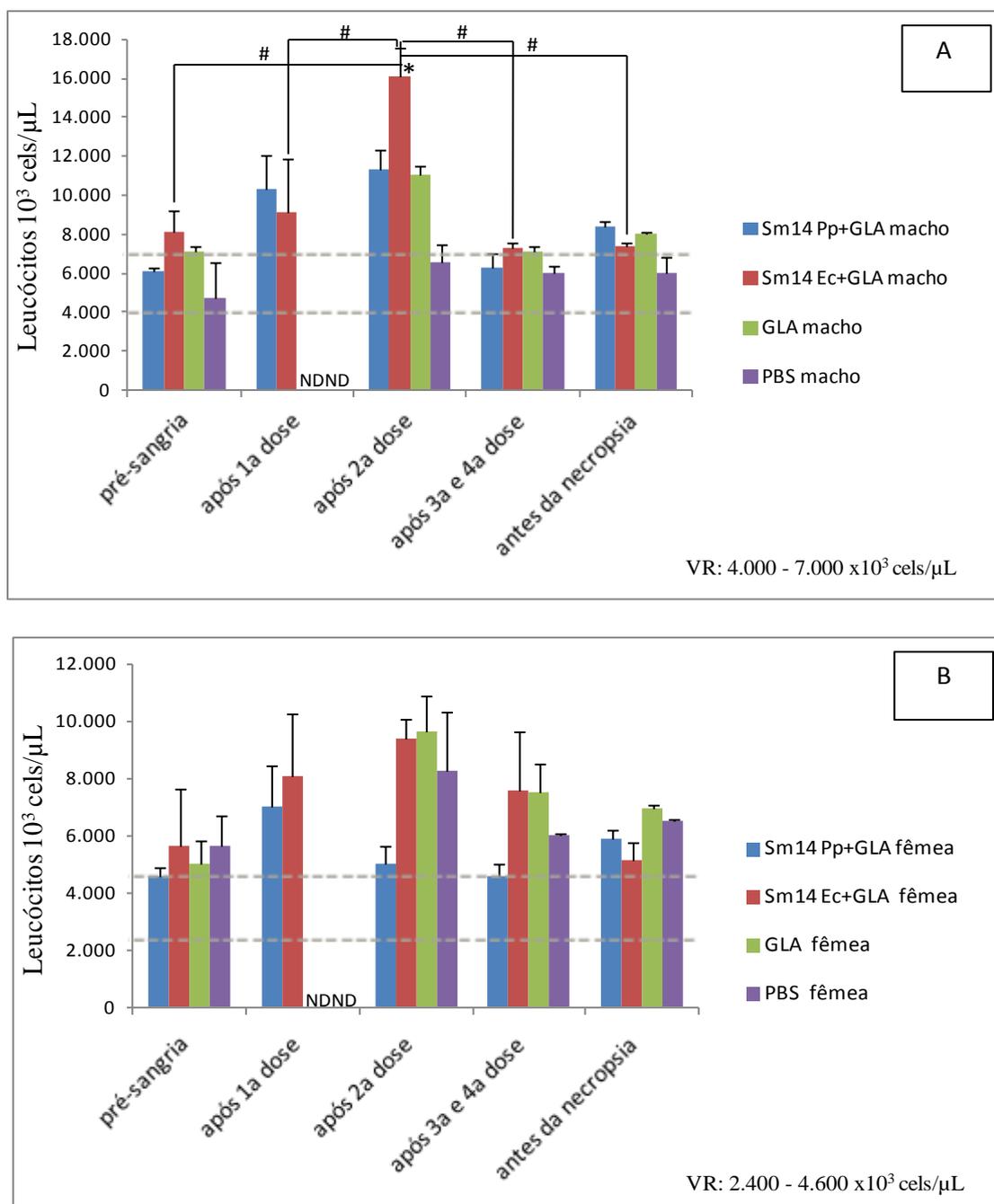
As flutuações da contagem de linfócitos ao longo do tempo do experimento foram mais discretas nos machos do que nos grupos das fêmeas (Figura 44A e B). Em todos os grupos, a distribuição da contagem dos linfócitos no fim do experimento se deslocava para valores mais baixos quando comparada ao resultado obtido antes da inoculação. Em todos os períodos do experimento, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de estudo em cada intervalo de tempo e do mesmo grupo nos diferentes intervalos de tempo para machos e fêmeas. Quando comparou-se por sexo, houve diferença estatística significativa quando se avaliou o grupo A (Sm14*Pp*+GLA) após a 4ª dose e o grupo D (controle) após a 2ª dose, segundo o teste t-student não pareado.

A contagem dos neutrófilos nos machos apresentou uma elevação acima do limite normal nos grupos A (Sm14*Pp*+GLA) e B (Sm14*Ec*+GLA) após a 1ª dose e nos grupos A (Sm14*Pp*+GLA), B (Sm14*Ec*+GLA) e C (GLA) após a 2ª dose (Figura 45A). Após a 3ª e 4ª dose ocorreu uma diminuição de aproximadamente 50% na média da contagem de neutrófilos

nos 4 grupos, mas ao final do estudo o número de neutrófilos já se encontravam dentro da faixa de normalidade. Nos grupos das fêmeas somente ocorreu uma elevação após a 2ª dose nos grupos B (Sm14 *Ec* +GLA) e C (GLA), porém, houve uma normalização até o final do estudo (Figura 45B). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo B dos machos quando se comparou o intervalo após a 2ª dose em relação os intervalos de tempo correspondentes à pré-sangria e após a 1ª e 4ª doses e para o grupo C quando se comparou os intervalos correspondentes a pré-sangria e após a 2ª dose. Foi observado também no grupo dos machos, uma diminuição estatisticamente significativa quando se comparou o grupo B (Sm14*Ec*+GLA) em relação ao grupo D (PBS) após a 2ª dose. No grupo das fêmeas verificou-se um aumento da contagem de neutrófilos estatisticamente significativo para os grupos B e C quando se comparou em ambos os intervalos correspondentes a pré-sangria e após 2ª dose. Quando comparou-se por sexo, houve diferença estatística significativa quando se avaliou o grupo B (Sm14*Ec*+GLA) após a 2ª dose e o grupo D (controle) após a 4ª dose, segundo o teste t-student não pareado.

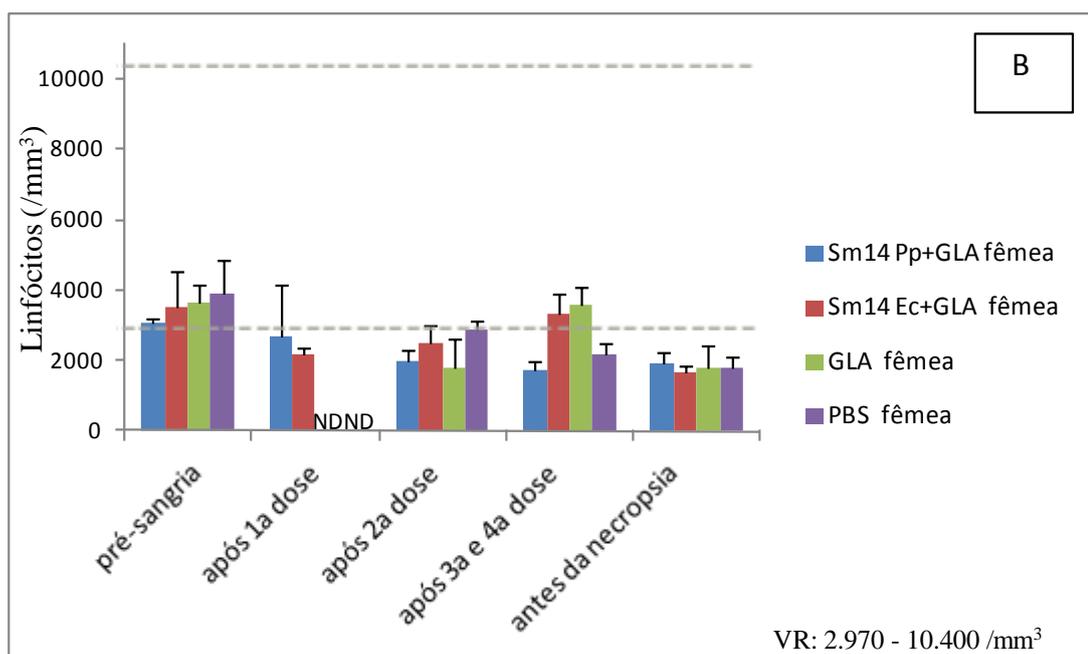
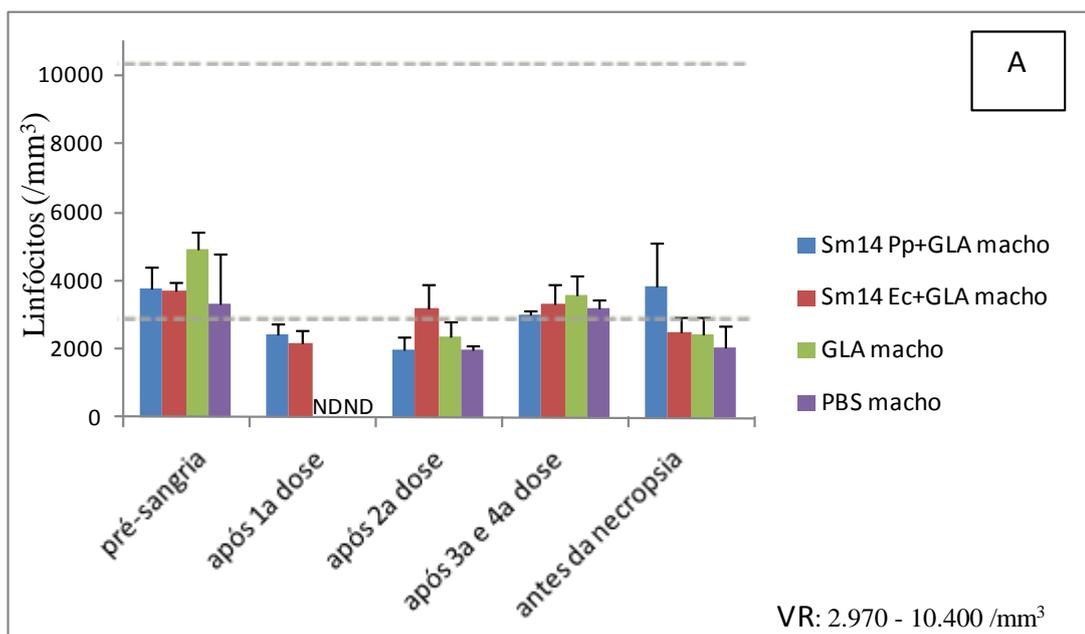
O Quadro 3 sumariza os resultados hematológicos em relação ao controle e temporal.

Figura 43 – Níveis de leucócitos



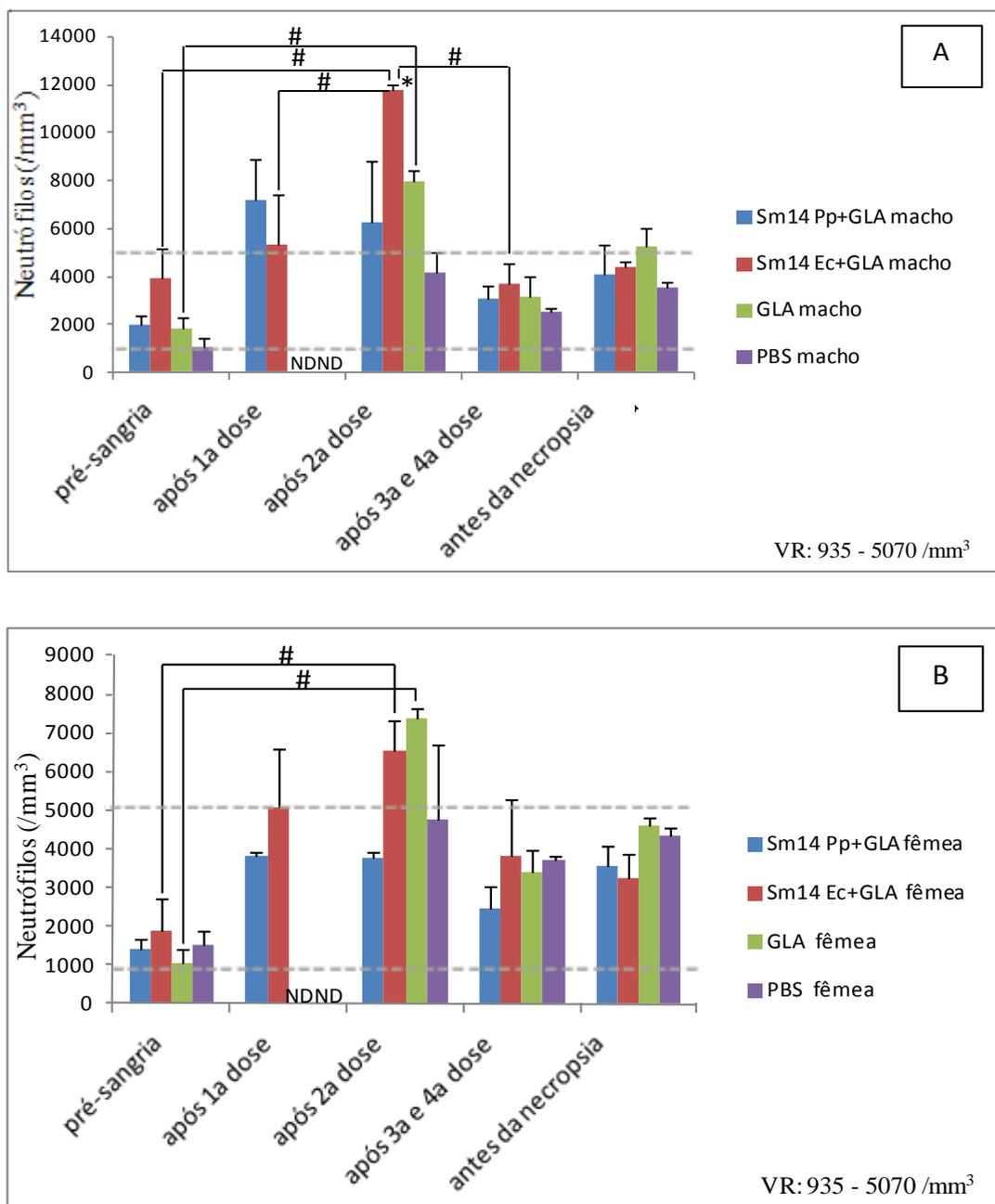
As dosagens dos níveis de leucócitos em  $10^3$  cels/ $\mu$ L foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de leucócitos para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 44 – Níveis de linfócitos



As dosagens dos níveis de linfócitos em /mm<sup>3</sup> foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1<sup>a</sup> dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de linfócitos para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 45 – Níveis de neutrófilos



As dosagens dos níveis de neutrófilos em /mm<sup>3</sup> foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1<sup>a</sup> dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado ao controle e # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **VR**: representa o valor de referência de neutrófilos para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

**Quadro 3 – Resumo dos resultados hematológicos em relação ao controle e tempo.**

| Parâmetros   | Grupos Experimentais |   |             |   |     |   |
|--|----------------------|---|-------------|---|-----|---|
|  | Sm14Pp +GLA          |   | Sm14Ec +GLA |   | GLA |   |
|  | M                    | F | M           | F | M   | F |
| Hemácias   | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Hemoglobina  | ↑                    | — | —           | — | b   | — |
| Hematócrito  | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Volume Corpuscular Médio (MCV)                       | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Hemoglobina Corpuscular Média (MCH)                  | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Plaquetas  | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Reticulócitos  | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Leucócitos   | —                    | — | h↓          | — | —   | — |
| Linfócitos   | —                    | — | —           | — | —   | — |
| Neutrófilos  | —                    | — | a,d,f↓      | a | a   | a |

↑: aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle pós 2ª dose. ↓: redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle pós 2ª dose. —: ausência de diferença estatística significativa em relação ao controle. **a**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e pós 2ª dose; **b**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e pós 4ª dose; **d**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 1ª dose e pós 2ª dose; **f**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 2ª dose e pós 4ª dose; **h**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós 2ª dose e os demais intervalos.

## 5.6 PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO

### 5.6.1 Protrombina (PTB) e Tempo de Tromboplastina (PTT)

Desordens na cascata de coagulação conferem ao animal uma coagulopatia. Os testes de tempo de protrombina (PTB) e tempo de tromboplastina (PTT) são considerados os testes de triagem para avaliação de defeitos da coagulação. O PTB avalia as via extrínseca e comum da coagulação e o PTT avalia os fatores das vias intrínseca e comum da coagulação (MILLER; GONÇALVES, 1999).

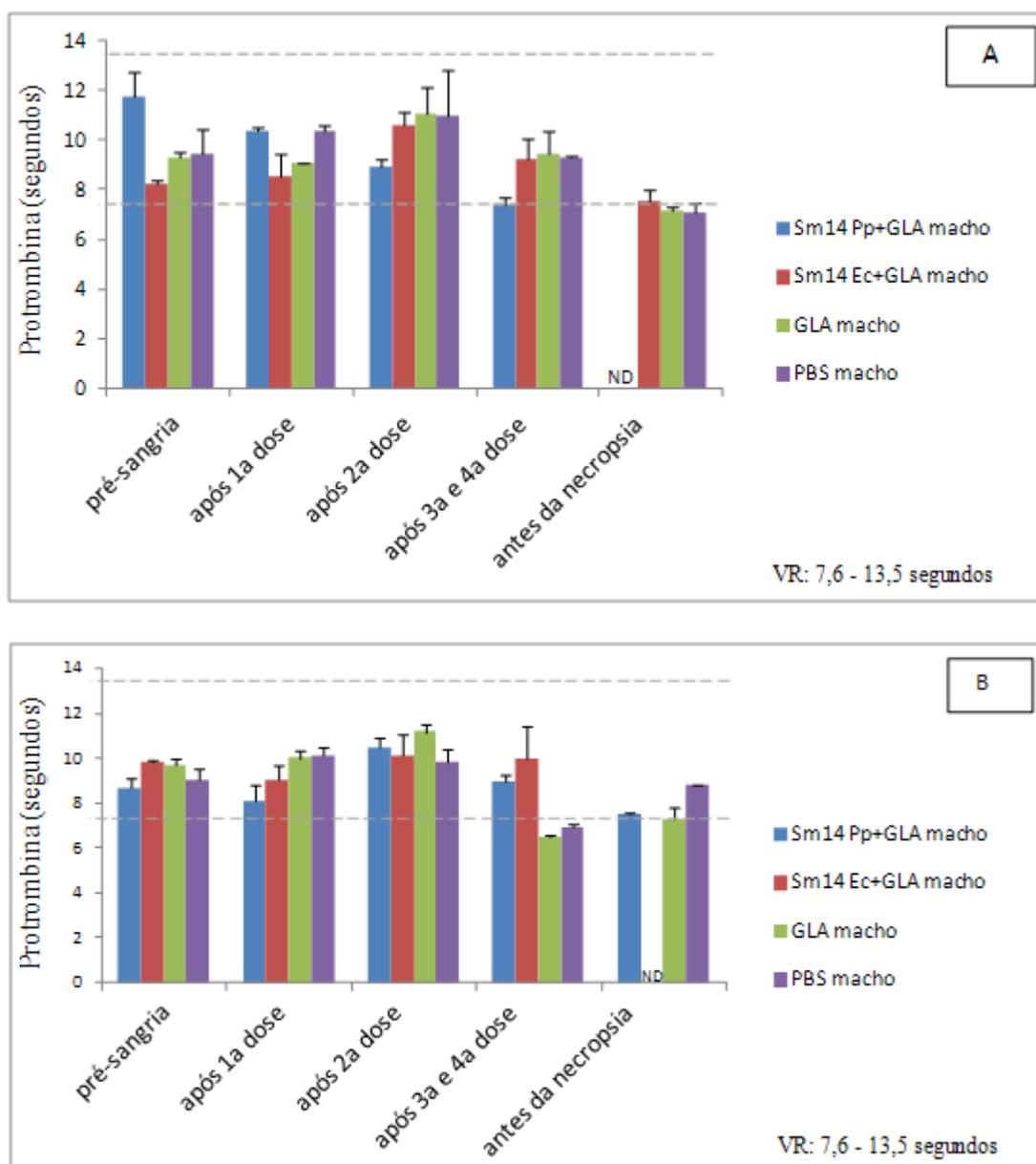
A maioria dos grupos de machos e fêmeas apresentaram tempo de PTB dentro do limite da normalidade (Figura 46A e B). Observou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos correspondentes ao intervalo da 1ª dose dos machos e quando se avaliou o tempo de protrombina do grupo A (Sm14Pp+GLA) das fêmeas nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn não mostrou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), na comparação entre os grupos referentes ao intervalo da 1ª dose dos machos e entre os diferentes intervalos de tempo do grupo Sm14Pp+GLA das fêmeas. Quanto ao tempo de protrombina, quando efetuou-se uma comparação por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

Com relação ao tempo de tromboplastina (PTT), exceto o grupo B (Sm14Ec+GLA) das fêmeas, todos os demais animais apresentaram PTT dentro dos limites normais na pré-sangria, entretanto houve uma diminuição a partir da 1ª dose, estendendo-se até o término do estudo (antes da necropsia), período em que todos os grupos atingiram níveis abaixo da normalidade (Figura 47A e B). Observou-se que a redução citada foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo B (Sm14Ec+GLA) das fêmeas, quando se comparou os intervalos de tempo correspondentes aos períodos da pré-sangria e após a 2ª dose (Figura 47B). Verificou-se através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando se comparou o tempo de tromboplastina do grupo A (Sm14 Pp + GLA) dos machos e o grupo D (Controle) das fêmeas nos diferentes intervalos de tempo. Porém, o teste de Dunn não apresentou diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), entre os diferentes intervalos de tempo do grupo A (Sm14 Pp + GLA) dos machos e do grupo D (Controle) das fêmeas (Figura 47A e

B). Quando comparou-se por sexo, não foi observada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos avaliados, segundo o teste de Dunn.

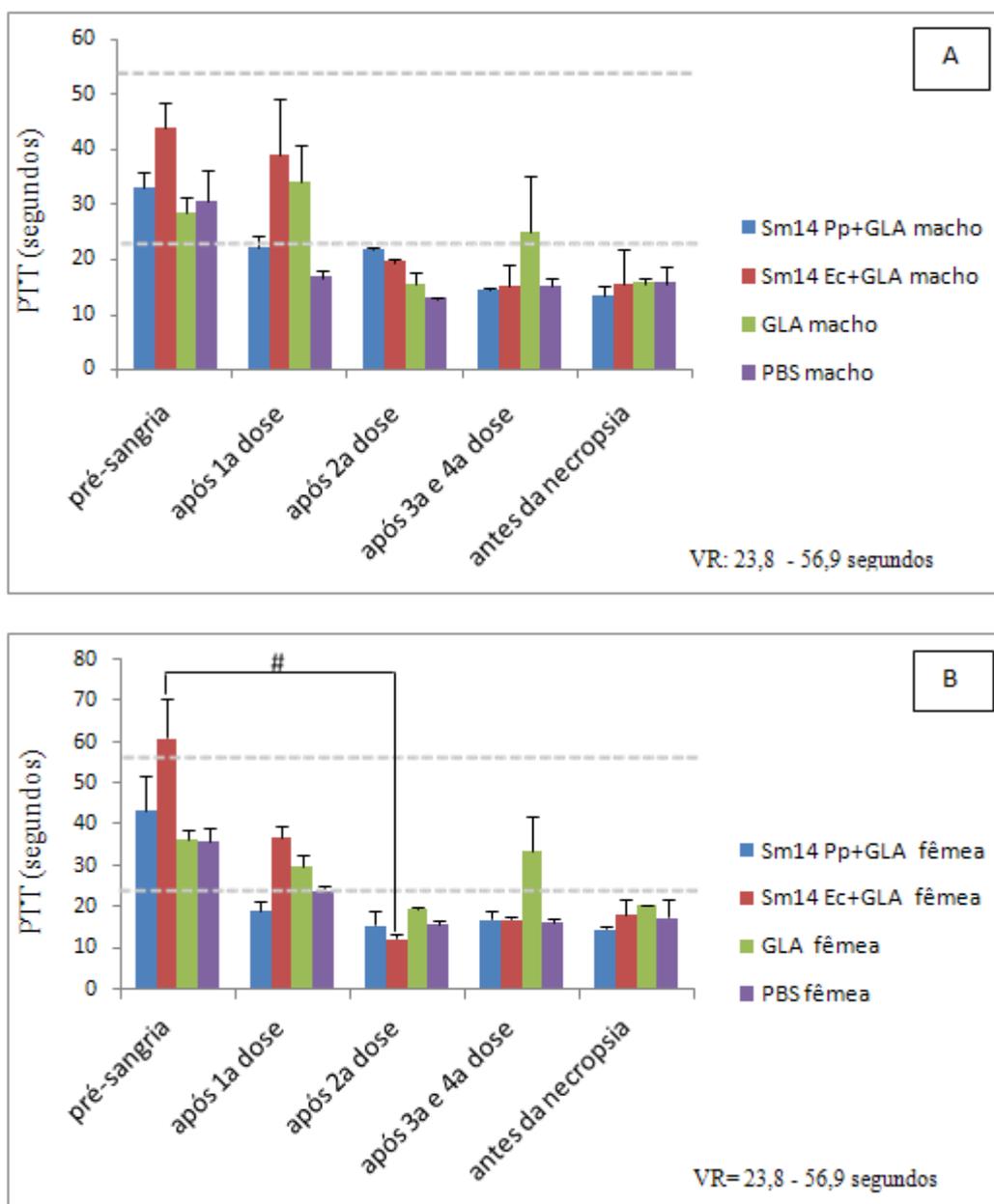
O Quadro 4 sumariza os resultados dos parâmetros de coagulação em relação ao controle e temporal.

Figura 46 – Determinação do PTB



As determinações dos tempos de protrombina em segundos foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. As linhas tracejadas indicam os limites de normalidade. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. Não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de protrombina para coelhos. **ND**: representa insuficiência de amostra.

Figura 47 – Determinação do PTT



As determinações dos tempos de tromboplastina em segundos foram efetuadas em machos (A) e fêmeas (B) anteriormente à 1ª dose vacinal e posteriormente às inoculações dos antígenos vacinais Sm14Pp+GLA e Sm14Ec+GLA, do adjuvante GLA e do controle PBS. Cada barra representa média  $\pm$  SE de no máximo 3 animais. # $p < 0,05$  na comparação entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **VR**: representa o valor de referência de PTT para coelhos.

**Quadro 4 – Resumo dos resultados dos parâmetros de coagulação em relação ao controle e tempo.**

| Parâmetros                    | Grupos Experimentais |   |             |                |     |   |
|-------------------------------|----------------------|---|-------------|----------------|-----|---|
|                               | Sm14Pp +GLA          |   | Sm14Ec +GLA |                | GLA |   |
|                               | M                    | F | M           | F              | M   | F |
| Protrombina (PTB)             | —                    | — | —           | —              | —   | — |
| Tempo de Tromboplastina (PTT) | —                    | — | —           | — <sup>a</sup> | —   | — |

— : ausência de diferença estatística significativa em relação ao controle. **a**:  $p < 0,05$  entre os intervalos pós pré-sangria e pós 2ª dose.

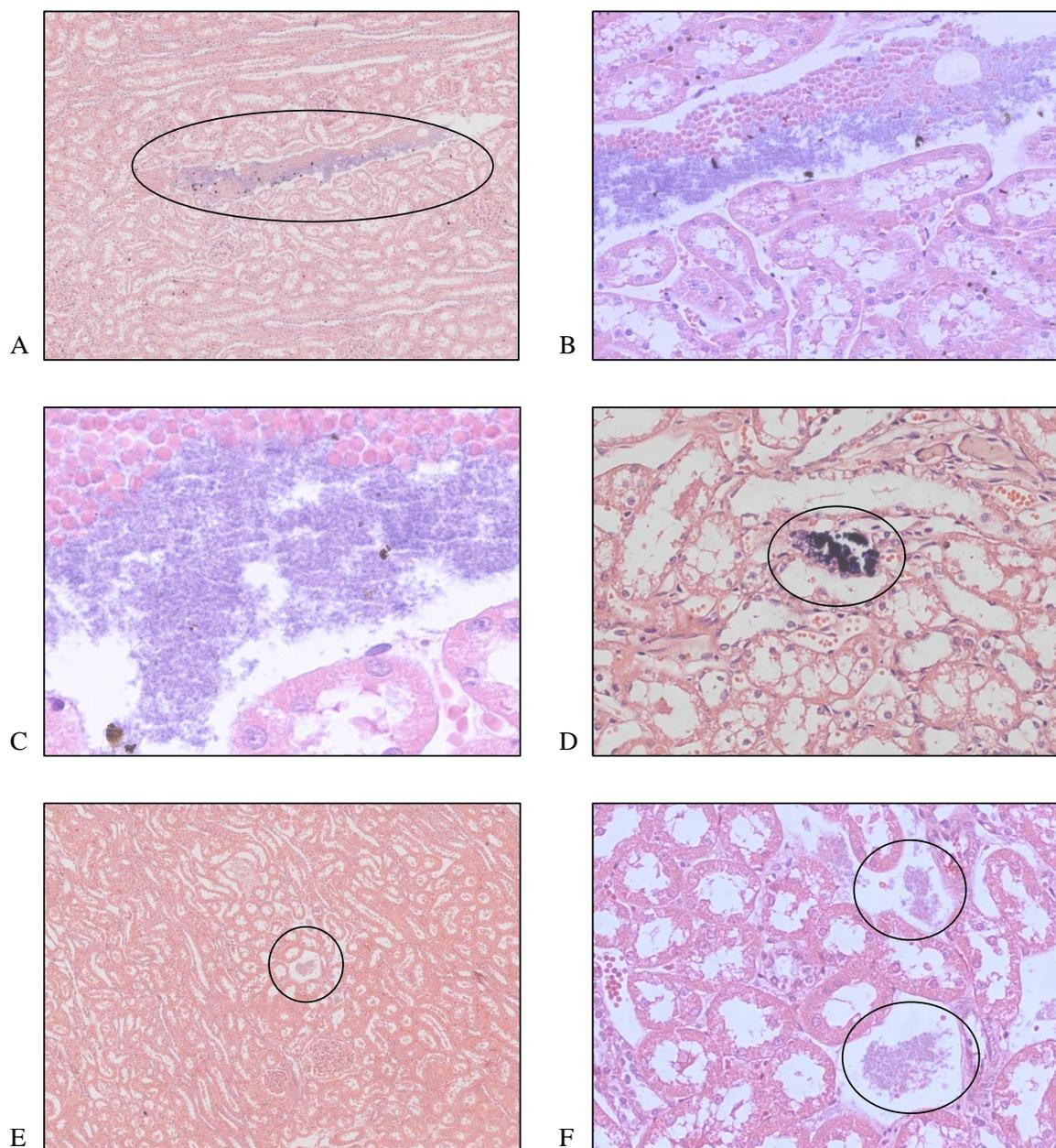
## 5.7 RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

De acordo com o protocolo adotado e cedido pelo IDRI (Infectious Disease Research Institute) as necropsias foram realizadas nos dias 57 e 71 do experimento. No dia 57 foram eutanasiados e necropsiados 13 coelhos, sendo 3 animais do grupo A (1 macho e 2 fêmeas), 4 animais do grupo B (2 machos e 2 fêmeas), 3 animais do grupo C (2 machos e 1 fêmea) e 3 animais do grupo D (2 machos e 1 fêmea). No dia 71 foram eutanasiados e necropsiados 8 coelhos, sendo 1 macho e 1 fêmea de cada grupo. Os exames anatomopatológicos foram realizados pela Laborlife Análises Clínicas LTDA.

Os pesos de todos os órgãos e estruturas analisadas dos coelhos nos diferentes grupos experimentais, descritos no item 4.3.5.3, encontravam-se dentro da normalidade.

Na avaliação anatomopatológica, observou-se que todos os grupos, inclusive o grupo controle, apresentaram pequenos focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular do rim e variaram de 60% nos grupos A e B (Sm14 *Pp* +GLA e Sm14 *Ec* + GLA respectivamente) e 40 % nos grupos C (Adjuvante/GLA) e D (Controle/PBS) (Figura 48).

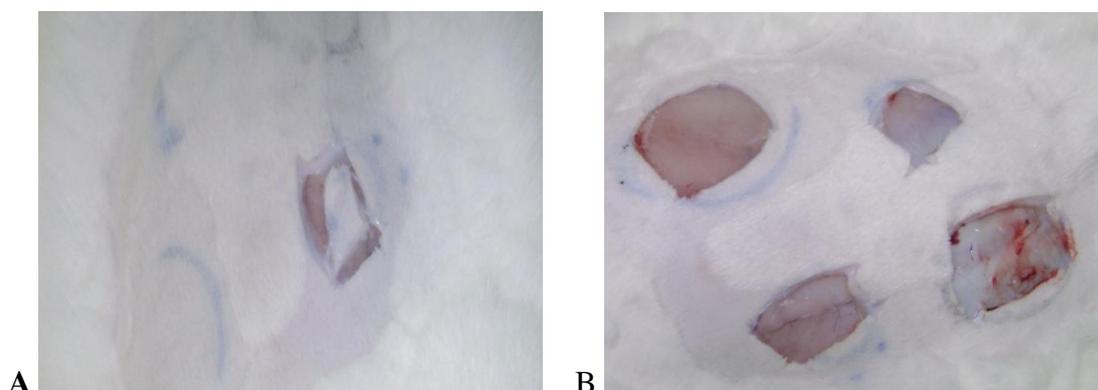
**Figura 48 - Fotomicrografia de corte histológico de tecido renal de coelho**



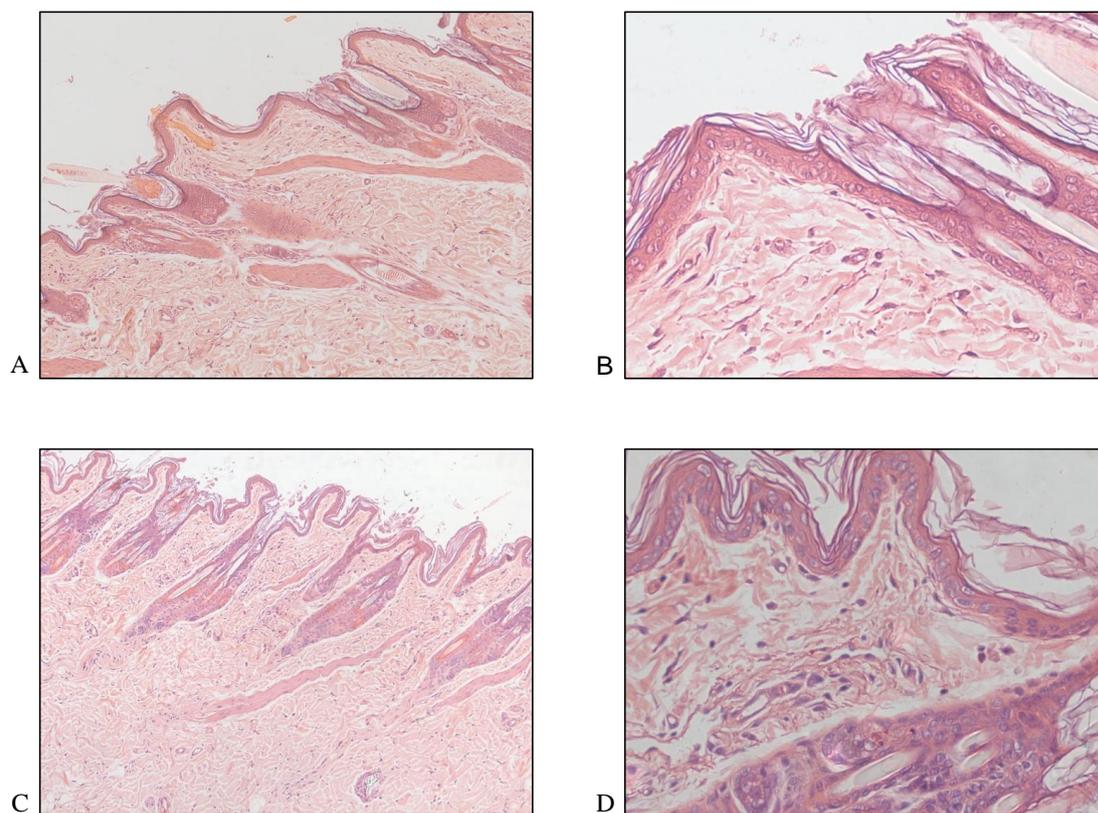
Coelho 973 (A, B e C) – Fotomicrografia de corte histológico de tecido renal de coelho do grupo controle/PBS: (A) – Córtex renal apresentando glomérulos e túbulos habituais e área com foco de calcificação basofílico (círculo); (B e C) – Detalhe da área de calcificação (A: 10 x HE negativo; B: 40 x HE negativo; C: 100 x HE negativo). Coelho 992 (D) – Área focal de calcificação na região tubular renal de coelho do grupo controle/PBS (10 x HE negativo). Coelho 975 (E e F) – Região de córtex renal de coelho do grupo Sm14Pp+GLA com foco de calcificação (círculo) (E: 10 x HE negativo; F: 40 x HE negativo).

Foram retiradas especialmente a pele e tecido subcutâneo dos locais da injeção dos animais imunizados (Figura 49A e B). Os resultados dos exames, individuais, mostraram ausência de alterações histopatológicas significativas na pele do local das imunizações (Figura 50).

**Figura 49 - Macroscopia da pele dos coelhos demonstrando os locais de aplicação das injeções (A) e a coleta de amostras destes locais para exame histopatológico (B)**



**Figura 50 - Fotomicrografia de corte histológico de pele de coelho**



Coelho 993 (A) – Fotomicrografia de corte histológico de pele de coelho do grupo controle/PBS demonstrando epiderme, derme, anexos cutâneos e músculos pilo-erectores normais (HE 10 x negativo); (B) – Detalhe da foto A mostrando epiderme queratinizada, derme e folículos pilosos habituais (HE 40 x negativo). Coelho 982 (C) – Fotomicrografia de corte histológico de pele de coelho do grupo Sm14Pp+GLA demonstrando epiderme, derme, anexos cutâneos e músculos pilo-erectores normais (HE 10 x negativo); (D) – Detalhe da foto C mostrando epiderme queratinizada, derme e folículos pilosos habituais (HE 40 x negativo).

Com exceção do grupo B (Sm14Ec + GLA), em todos os outros grupos, inclusive no controle, foi verificado um coelho com leve e focal infiltrado inflamatório na próstata.

Obteve-se um laudo anatomopatológico da coelha do grupo C (GLA) que foi encontrada morta, elaborado pelas médicas veterinárias patologistas. Observou-se secreção avermelhada ao redor do focinho, olhos muito congestos, hematoma muito acentuado na traquéia, na abertura das cavidades corpóreas *livor mortis* de abdômem, hemotórax, lobos pulmonares finais aderidos ao diafragma, pulmão congesto e espuma avermelhada na traquéia (edema), órgãos abdominais muito autolizados. Os achados microscópicos demonstraram traquéia com hiperemia e presença de pigmento acastanhado em vasos e em tecido adiposo, os pulmões exibiam brônquios com hiperemia, áreas de colabamento e ruptura de septos interalveolares e macrófagos fagocitando pigmento acastanhado, o fígado apresentava hiperemia e pigmento acastanhado nos sinusóides. Os demais órgãos não apresentavam alterações anatomopatológicas significativas.

A Tabela 3 sumariza os resultados anatomopatológicos.

Tabela 3 - Resultados Anatomopatológicos

| <b>Resultados Anatomopatológicos</b> |  |   |
|--------------------------------------|--|---|
| <b>Grupos</b>                        | <b>Machos</b>  | <b>Fêmeas</b>   |
| <b>Sm14Pp +GLA</b>                   | (1) Sem alterações significativas<br>(1) Próstata (Leve e focal infiltrado inflamatório)<br>(1) Óbito  | (3) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular)   |
| <b>Sm14Ec +GLA</b>                   | (2) Sem alterações significativas<br>(1) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular)   | (3) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular)   |
| <b>GLA-SE</b>                        | (1) Sem alterações significativas<br>(1) Próstata (Leve e focal infiltrado inflamatório)<br>(1) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular)  | (1) Sem alterações significativas<br>(1) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular)<br>(1) Óbito   |
| <b>PBS</b>                           | (1) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular) e Próstata (Leve e focal infiltrado inflamatório)<br>(1) Fígado (Área focal de leve infiltrado inflamatório)<br>(1) Testículos (Poucos túbulos seminíferos com células de linhagem germinativa sofrendo degeneração) | (1) Sem alterações significativas<br>(1) Rim (Focos de calcificação em 5% dos túbulos da cortical e medular) e Jejunó Proximal (Granuloma composto por células gigantes de corpo estranho)<br>(1) Óbito |

( ) = Quantidade de coelhos

## 6 DISCUSSÃO

Muitas discussões científicas, especialmente no passado, buscaram definir critérios para uma avaliação adequada sobre os estudos pré-clínicos relacionados à toxicidade de produtos farmacêuticos.

Atualmente, existe uma harmonização nos guias das agências e instituições internacionais como os propostos pelo Comitê Internacional sobre Harmonização (ICH), o EMEA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY), a OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT) e pelo FDA. Esta harmonização é importante porque representa uma opinião de consenso científico, promove a coerência, melhora a qualidade dos estudos realizados e fornece uma orientação para os responsáveis por projetos de estudos de toxicidade pré-clínica (SERABIAN; PILLARO, 1999).

Os estudos de toxicidade de doses repetitivas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo e histopatológicas (BRASIL, 2010).

Este projeto propôs um estudo pré-clínico de toxicidade de doses repetidas, adotando um protocolo do FDA como referência (Protocolo Toxicológico adotado e desenvolvido por BAS Evansville e Corixa Corporation (2002), segundo as normas do FDA Good Laboratory Practice Regulations (21CRF Part 58) e CPMP guidance documents (CPMP/SWP/465/95 e CPMP/ICH302/95).

A perda de peso é um indicativo de efeitos tóxicos (STEVENS; MYLECRAINE, 1994). Segundo o Programa Nacional de Toxicologia (NTP) dos Estados Unidos é importante que os animais não percam mais do que 10 % do seu peso corporal inicial (EATO; KLASSEN, 1996). No presente estudo, foi avaliado o peso corporal dos coelhos. Os resultados mostram que com relação às variações na evolução ponderal, não houve diferença de peso estatisticamente significativa entre os grupos e todos os resultados encontrados estão de acordo com os dados fisiológicos esperados para coelhos (COUTO, 2006).

Em relação ao consumo de ração e de água, não foi verificada nenhuma alteração significativa, todos os grupos do estudo, inclusive o grupo controle apresentaram o mesmo padrão para o consumo de ração e ingestão de água. A determinação do consumo de ração e água é muito importante nos estudos de segurança de produtos com finalidade terapêutica, uma vez que a ingestão adequada de água e ração são essenciais para a manutenção fisiológica do animal e para se obter resposta adequada ao produto testado; e não uma “falsa

resposta”, devido às condições nutricionais inadequadas (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003; STEVENS; MYLECRAINE, 1994).

Estes dados em conjunto sugerem que o antígeno r-Sm14 e o adjuvante GLA não afetam o apetite e nem o ganho de peso corporal dos coelhos e por isso tem-se um indicativo de segurança do mesmo.

As observações clínicas diárias são consideradas de fundamental importância (EATON; KLASSEN, 1996; STEVENS; MYLECRAINE 1994). Na avaliação clínica diária não foram observadas alterações relacionadas ao nível de estresse, aspecto físico, comportamento e mortalidade que pudessem indicar uma ação tóxica do preparado vacinal. Os animais imunizados com Sm14*Pp* + GLA-SE, Sm14*Ec* + GLA-SE e GLA não apresentaram alterações em relação ao grupo controle.

Quanto aos resultados da avaliação bioquímica, hematológica e dos parâmetros de coagulação, a maioria dos parâmetros analisados variou dentro dos padrões de normalidade (mesmo quando havia significância estatística nas análises) e a maioria dos resultados dos parâmetros obtidos para todos os grupos do estudo mostraram-se bastante homogêneos quando observados no mesmo intervalo de tempo.

Ressalta-se que todos os animais, inclusive os do grupo controle, apresentaram os níveis de uréia aumentado desde a 1ª coleta (denominado de intervalo de tempo pré-sangria), sendo este fato associado à dieta utilizada nos coelhos no biotério de experimentação animal da Fiocruz. A taxa de uréia sérica sofre alteração diante de dietas hiperprotéicas, de modo geral, a uréia é um indicador sensível e imediato da ingestão de proteína (MEYER; HARVEY, 1998). De acordo com o recomendado pelo National Research Council (1977), o nível de proteína bruta recomendável para coelhos em manutenção deve ser de 16%, entretanto, o valor encontrado na ração, utilizada na alimentação dos coelhos, na época do desenvolvimento do estudo, foi acima de 17%.

Os coelhos, como toda espécie animal, são susceptíveis a situações estressantes que podem levar a alterações metabólicas que promovam a síntese e liberação de hormônios hiperglicemiantes como a adrenalina e corticosterona (glicocorticóide) (ANDERSEN; SOUZA, 2009; MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). Uma vez que os grupos Sm14*Pp*+GLA, Sm14*Ec*+GLA, GLA e o grupo controle (PBS), apresentaram oscilações nos níveis de glicose ao longo do experimento, sugere-se que houve uma resposta biológica ao estresse ocasionado provavelmente durante o procedimento de coleta sanguínea dos animais.

Foi observado um aumento significativo de leucócitos em ambos os sexos, nos grupos vacinados com Sm14*Pp*+GLA e Sm14*Ec*+GLA. No entanto, também foi observado este

aumento nos animais inoculados apenas com adjuvante GLA. Desta forma é provável que as alterações verificadas nestes dois grupos sejam resultado de uma ativação inespecífica do sistema imunológico desses animais gerada pelo adjuvante GLA (COLER et al., 2011).

Em relação ao estudo de toxicidade local, foi realizada uma análise criteriosa sobre os efeitos locais da vacina (no local de aplicação). Para este tipo de avaliação, foram feitas, após as aplicações do antígeno vacinal, observações clínicas cuidadosas dos sítios de injeção, onde não foram observadas, em todos os grupos vacinados, qualquer alteração indicativa de processo inflamatório no local da aplicação. Sugerindo com isso que o antígeno vacinal não apresenta efeito tóxico local. Fragmentos correspondentes aos sítios de injeção e tecidos circundantes foram recolhidos de todos os locais das injeções (todas as 4 doses) nos animais e submetidos a um exame histológico. Foram obtidos laudos conclusivos, elaborados por uma médica veterinária patologista, onde não há qualquer indicação ou resquício de reação inflamatória local ou de qualquer indicação que permita que se suspeite de ação tóxica local, corroborando com as observações clínicas realizadas após a aplicação do antígeno vacinal.

Todos os grupos apresentaram pequenos focos de calcificação nos rins, variando de 60% nos grupos A e B (Sm14 *Pp* +GLA e Sm14 *Ec* + GLA respectivamente) e 40 % nos grupos C (GLA) e D (PBS). Esses achados, observados em apenas 5% dos túbulos da cortical e medular do rim, não são indicativos de qualquer ação tóxica ou comprometedora da saúde dos animais em decorrência da imunização com o antígeno r-Sm14-GLA. Ao contrário, estes achados, muito conhecidos e objeto de inúmeras publicações estão relacionados a condições nutricionais dos coelhos. Estes animais são muito suscetíveis à calcificação, cuja ocorrência natural nessa espécie está associada à hiperavitaminose D e ao excesso de cálcio e fósforo na alimentação (MATIAS et al., 2008; MENEZES et al., 2003; RITSKES-HOITINGA et al., 2004). A mineralização renal está associada a qualquer condição que resulte em aumento de níveis do cálcio sérico superando a capacidade do rim de excretar o mineral. As condições que resultam em aumento dos níveis sanguíneos do cálcio podem ser dieta com altos níveis de cálcio, aumento de vitamina D e desbalanceamento dos minerais cálcio e fósforo (que deve obedecer à proporção 2:1). A maioria das rações comerciais para coelhos não tem o balanceamento correto, com a quantidade de cálcio excedendo em quase o dobro o que é preconizado para nutrição dessa espécie. A ração utilizada na dieta dos coelhos da Fundação Oswaldo Cruz, quando realizado o estudo, era da marca Guabi que possui registro no Ministério de Abastecimento Agricultura e Pecuária (MAPA), porém as concentrações de cálcio, fósforo e Vitamina D (nutrientes associados à calcificação natural em coelhos) identificadas no rótulo de identificação do produto estavam acima dos índices recomendados

pelo NRC. Para diversos autores, concentrações elevadas desses minerais na dieta de coelhos pode ter como conseqüências lesões nos túbulos renais, calcificação de tecidos moles como artéria aorta e rins, formação de cálculos renais, na medida em que o metabolismo de cálcio nesses animais é incomum e os seus mecanismos de homeostasia não são tão eficazes como em outros mamíferos (CHEEKE, 1994; KAMPHUES, 1991; KAMPHUES et al., 1986; IRLBECK, 2001).

De acordo com Kamphues (1991) e Peixoto e colaboradores (2010), a quantidade de vitamina D presente na ração recomendada para coelhos deve ser inferior a 1000UI por kg dessa vitamina, porém a quantidade de vitamina D presente na ração utilizada para alimentar os coelhos do teste toxicológico estava acima do recomendado (1500 UI por kg). Com relação à concentração de cálcio, essa estava acima do recomendado pelo National Research Council (1977), que determina que a concentração desse mineral na dieta de coelhos deve ser de 0,4 a 0,75%, sendo que o valor encontrado na ração foi de 1,5%. O nível de fósforo também se encontrava acima do recomendado pelo NRC (1977), cujo valor não poderia ser superior a 0,22% na dieta de coelhos, o valor encontrado foi de 0,45%. O fato de que os animais do grupo controle do estudo também apresentaram os mesmos achados, reforça assim a conclusão substantiada pelas referências científicas citadas, no sentido de que estes focos de calcificação nos rins são comuns em coelhos, evidenciando dessa forma, que não houve ação tóxica nem residual que pudesse afetar a completa integridade física dos animais testados.

O excesso de uréia, vitamina D, cálcio e fósforo na dieta dos coelhos encontrados no presente estudo, evidenciam a necessidade de uma revisão e análise periódica dessas substâncias nas rações comerciais desses animais.

A alteração encontrada na próstata descrita no item 5.7, não pode ser considerada indício de ação tóxica em decorrência da imunização com o antígeno r-Sm14-GLA, uma vez que o grupo controle também apresentou a alteração em questão.

A coelha do grupo C (GLA) veio a óbito por insuficiência respiratória devido ao hemotórax e ao edema pulmonar, o que é indicativo de trauma exógeno (CASWELL; WILLIAMS, 2007; SANTOS; GUEDES, 2011).

Assim, com relação aos resultados anatomopatológicos, pode-se concluir que não foram observadas alterações histopatológicas indicativas de lesões teciduais induzidas pelas diferentes formulações da proteína r-Sm14 e/ou adjuvante, sugerindo um alto grau de segurança do antígeno vacinal.

As variações observadas nos exames laboratoriais de sangue não indicaram acometimento importante na saúde dos animais. Coerentemente, os animais não evidenciaram

alterações clínicas relevantes associadas ao estudo e não foi observada nenhuma alteração macroscópica ou histopatológica, que representasse significado clínico.

A segurança do adjuvante GLA-SE observada nesse estudo, está de acordo com outros estudos, como o realizado por Coler e colaboradores em 2010, conduzido em macacos *Cynomolgus*, onde se avaliou a segurança do GLA-SE como adjuvante da vacina Influenza Fluzone<sup>®</sup>. Os resultados demonstraram ausência de toxicidade local e sistêmica nos animais que receberam a vacina Fluzone + GLA-SE ou somente o adjuvante GLA-SE.

Experiências prévias pré-clínicas e clínicas positivas com a vacina contra o vírus da hepatite B, que por ser recombinante é a mais semelhante ao produto investigacional utilizado nesse estudo, é muito importante (ASSAD; FRANCIS, 1999).

De acordo com Makidon e colaboradores (2008), um estudo pré-clínico conduzido em vários modelos animais, utilizando a via nasal para inoculação das doses, foi realizado para se obter uma avaliação toxicológica aguda e crônica de uma formulação contendo antígeno recombinante do vírus da hepatite B e nanoemulsões como adjuvante (HBSAg-NE). Tanto nos experimentos utilizando dose única, quanto doses repetitivas, não foram observadas alterações no apetite e no peso dos animais durante o estudo. Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais estavam dentro da faixa fisiológica normal. Através da avaliação histopatológica, foi possível demonstrar que o antígeno recombinante (HBSAg-NE) não foi capaz de induzir qualquer alteração morfológica no epitélio nasal (local da aplicação) e nos outros órgãos e tecidos estudados.

Os resultados apresentados neste trabalho, utilizando o antígeno recombinante Sm14, corroboram com os achados de segurança do produto vacinal demonstrados por Makidon e colaboradores (2008), que utilizaram da mesma forma uma vacina recombinante.

É importante ressaltar que a vacina contra esquistossomose, baseada no Sm14 é um produto inovador de grande relevância social para a população brasileira, além de ser eficaz para a fasciolose, uma doença veterinária que causa grandes perdas econômicas para os rebanhos de produção (ovinos, bovinos e caprinos) a nível global (NAMBI, 2005; TENDLER; SIMPSON, 2008; SPITHILL; SMOOKER; COPERMAN, 1999).

Os resultados apresentados neste estudo, juntamente com o Dossiê do Sm14 e o Protocolo Clínico de Pesquisa foram submetidos a ANVISA e aprovados. O Teste Clínico Fase 1 em humanos, para avaliar a segurança do antígeno Sm14, já está em andamento e sendo conduzido pela equipe do IPEC (Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas).

## 7 CONCLUSÃO

- Na avaliação clínica diária não foram observadas alterações relacionadas ao consumo de ração e água, aspecto físico, nível de estresse, comportamento e mortalidade, que pudessem indicar uma ação tóxica do preparado vacinal.
- Com relação às variações na evolução ponderal, não houve diferença de peso estatisticamente significativa entre os grupos e todos os resultados encontrados estão de acordo com os dados fisiológicos esperados para coelhos.
- Quanto aos resultados da avaliação bioquímica e hematológica, a maioria dos parâmetros analisados variou dentro dos padrões de normalidade. Alguns parâmetros apresentaram diferença significativa embora sem correlação clínica.
- A análise anatomopatológica não evidenciou alterações macroscópicas e histopatológicas significativas na pele do local das imunizações e em todos os órgãos analisados.

Os resultados encontrados nesse estudo confirmaram a completa segurança do preparado vacinal, tendo sido extensamente demonstrado que a vacina r-Sm14-GLA não acarretou nenhuma ação tóxica ou residual que de alguma forma pudesse afetar a completa integridade física dos animais testados.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. S. et al. *Schistosoma mansoni* – NZ rabbit model: resistance due to infection and active immunization with adult worm antigen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, suppl. IV, p. 233, 1987.
- \_\_\_\_\_. Curative and protective activity in rabbits after reinfection with *Schistosoma mansoni*. A new model of immunity? **J. Parasitol.**, v. 75, p. 308-310, 1989.
- \_\_\_\_\_. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 3, p. 135-137, 2003.
- AL-SHERBINY, M. et al. R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica**, v. 88, p. 117-130, 2003.
- ANDERSEN, M. L.; SOUZA, M. C. Estresse e suas interferências. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 517-536.
- ANGELUCCI, F. et al. *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. **Biochemistry**, v. 43, p. 13000-13011, 2004.
- ASSAD, S.; FRANCIS, A. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. **Vaccine**, v. 18, p. 57-67, 1999.
- BALLOUL, J. M. et al. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. **Nature**, v. 326, n. 6109, p. 149-153, 1987b.
- BAS EVANSVILLE; CORIXA CORPORATION. **A Multiple dose Subcutaneous/Intramuscular Toxicity Study in Rabbits with Leish-11f and MPL-SE as Adjuvant**: Protocol. San Francisco, 2002. 28 p.
- BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 221-227, 1995.
- \_\_\_\_\_. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? **Parasitol Today**, v. 11, p. 191-194, 1997.
- \_\_\_\_\_. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 309-314, 2002.
- BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccines: research to development. **Parasitol Today**, v. 14, p. 99-104, 1998.

BERGQUIST N.R.; LEONARDO L.R.; MITCHELL G.F. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 3, p. 112-117, 2005.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.

BRASIL. ANVISA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/guia+para+a+condução+de+estudos+não+clínicos+de+segurança+necessários+ao+desenvolvimento+de+medicamentos.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 219 de 20 de setembro de 2004. Aprova o regulamento para elaboração de dossiê para a obtenção de comunicado especial (CE) para a realização de pesquisa clínica com medicamentos e produtos para a saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de setembro de 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988. Regulamenta o credenciamento de Centros de Pesquisa no país e recomenda a criação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em cada centro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de junho de 1988.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997. Aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

\_\_\_\_\_. **Portal da Saúde**: Esquistossomose. Brasília, [2011]. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1551](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551)>. Acesso em: 09 dez. 2011.

BRITO, C. F. et al. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scand. J. Immunol.**, v. 51, n. 6, p. 595-601, 2000a.

\_\_\_\_\_. Human IgG1 and IgG3 recognition of *Schistosoma mansoni* 14 kDa fatty acid-binding protein. **Parasite Immunol.**, v. 22, p. 41-48, 2000b.

- BUTTERWORTH, A. E. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment observations and results of treatment. **Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 108-123, 1984.
- CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. The respiratory system. In: JUBB, K.V.F. et al. **Pathology of domestic animals**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. v. 2, cap. 5, p. 523-654.
- CHEEKE, P.R. Nutrition and nutritional diseases. In: MANNING, D. H. et al. **The biology of the laboratory rabbit**. 2. ed. New York: Academic, 1994. Cap. 14, p. 321-333.
- CHEEVER, A. W. Pathogenesis of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. 4, p. 337-340, 1992.
- COLER, R. N. et al. A synthetic adjuvant to enhance and expand immune responses to influenza vaccines. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e13677, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0013677>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- \_\_\_\_\_. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. e16333, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016333>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- COSTA, E. A. Vigilância sanitária: proteção e defesa da saúde. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 357-387.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic áreas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, suppl. 1, p.13-19, 2004.
- COUTO, S. E. R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. p. 93-95.
- CROWE, J. et al. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. **Methods Mol. Biol.**, v. 31, p. 371-387, 1994.
- EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 13-33.
- EMANUELLI, M. P. et al. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9,n. 1, p. 251-255, 2008.

ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.**, v. 82, p. 139–146, 2002.

ENGERS, H.D. et al. Progress on vaccines against parasites. **Dev. Biol. Stand.**, v. 87, p. 73-84, 1996.

ERASMUS, D. A. A. Structural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, p. 1755-1764, 1986.

FONSECA, C. T. et al. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  dependent pathway. **Vaccine**, v. 22, p. 503-510, 2004a.

\_\_\_\_\_. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, suppl 1, p. 63-66, 2004b.

\_\_\_\_\_. Human t cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in áreas endemic for schistosomiasis. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 204-212, 2005.

\_\_\_\_\_. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone. **Microbes and Infection**, v. 20, p. 1-8, 2006.

GARCIA T. C. et al. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Acta Trop.**, v. 106, n. 3, p. 162-167, 2008.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: A importância da caracterização adequada das fases de pesquisa. **Revista HCPA**, v. 27, n. 1, 2007.

GRYSSELS, B. Human resistance to schistosomes: age or experience ? **Parasitol. Today**, v. 10, p. 380-384, 1994.

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

INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE. **Mission / vision**. Seattle, [2011]. Disponível em: <<http://www.idri.org/mission-vision.html>>. Acesso em 1 dez. 2011.

IRLBECK, N.A. How to feed the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) gastrointestinal tract. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, (E. Suppl.), p. 343-346, 2001.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, Norway, v. 123, n. 23, p. 3402-3405, 2003.

KAMPHUES, J. Calcium metabolism of rabbits as an etiological factor for urolithiasis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 121, suppl. 11, p. S95-S96, 1991.

KAMPHUES V.J. et al. Effects of increasing calcium and vitamin D supply on calcium metabolism of rabbits. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 56, p. 191-208, 1986.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003.

LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2003.

LÓPEZ-ABÁN, J. Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. **Vet. Parasitol.**, v. 145, n. 3/4, p. 287-96, 2007.

\_\_\_\_\_. The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. **Vet. Parasitol.**, v. 153, n. 1/2, p. 176-81, 2008.

MAKIDON, P. E. et al. Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis b mucosal vaccine. **Plos One**, v. 3, n. 8, p. e2954, 2008. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002954>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

MATIAS, A. S. A. et al. Prevalência e aspectos anatomopatológicos da mineralização metastática em coelhos provenientes de biotérios e criação comercial do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p.155-160, 2008.

MATTERI, R. L.; CARROLL, J. A.; DYER C. J. Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg, G. P.; Mench, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Califórnia: CABI Publishing, 2000. p. 43-76.

MENEZES, R. C. et al. Mineralização renal e da artéria aorta em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) convencionais provenientes de um biotério de criação. **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida, Seropédica**, v. 23, n. 1, p. 13-14, 2003.

MERCOSUL. Comissão de Produtos para a Saúde. Resolução n° 129/96. **Regulamento Técnico sobre a Verificação de Boas Práticas de Pesquisa Clínica**. Fortaleza, 1996. Disponível em: <[http://200.214.130.44/mercosulsaude/scripts/resolucao.asp?co\\_legislacao=55](http://200.214.130.44/mercosulsaude/scripts/resolucao.asp?co_legislacao=55)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Assessment of renal function, urinalysis, and water balance. In: Veterinary Laboratory Medicine. **Interpretation and diagnosis**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p.221-235.

MICHAUD, C. M.; GORDON, W. S.; REICH, M. R. **The global burden of disease due to schistosomiasis**. Cambridge: Harvard University, USA, 2003. (DCPP Working Paper 19).

- MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- MILLER, T. E.; WILSON, R. A. Migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, v. 77, p. 281-285, 1978.
- MMWR. Impact of vaccines universally recommended for children - United States, 1990-1998. **MMWR**, v. 48, p. 243-249, 1999a.
- \_\_\_\_\_. Eradication: Lessons from the past. **MMWR**, v. 48, p. 16-22, 1999b.
- MOSER, D. et al. A 14 Kda *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 13, p. 8447-8454, 1991.
- MURRAY C. J. L.; LOPEZ A. D. **The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020**. Cambridge: Harvard University Press, 1996.
- NAMBI, P. A. et al. Vaccination of buffaloes with *Fasciola gigantica* recombinant fatty acid binding protein. **Parasitol. Res.**, v. 97, n. 2, p. 129-135, 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of rabbits**. 2. ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1977.
- NELSON, R.W.;COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- PEARCE, E. J. et al. Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. **J. Immunol.**, v. 137, n. 11, p. 3593-600, 1986.
- \_\_\_\_\_. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 15, p. 5678-5682, 1988.
- PEIXOTO, P.V. et al. Aspectos toxicológico, clínico-patológico e ultraestrutural das intoxicações iatrogênica e experimental por vitamina D em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 277-288, 2010.
- PERSING, D.H. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. S32-S37, 2002.
- PLOTKIN, S. A.; MORTIMER, E. A. **Vaccines**, 2 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1994.
- PRÜSS A. et al. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, n. 5, p. 537-542, 2002.

RAMOS, C. R. R. **A proteína ligadora aos ácidos graxos Sm14 de *Schistosoma mansoni*: estrutura gênica, polimorfismo, expressão heteróloga em *E. coli* e significado estrutural e funcional das suas formas polimórficas e mutantes.** 2002. 129 f.. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

\_\_\_\_\_. **Development of a bivalent anti-helminth vaccine against schistosomiasis and fascioliasis based on the recombinant antigen Sm14.** Rio de Janeiro, 2008. Poster.

RAMOS, C. R. R. et al. r-Sm14 – pRSETA efficacy in experimental animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, suppl., p. 131-135, 2001.

\_\_\_\_\_. Gene structure and M20T polymorphism of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein: molecular, functional and immunoprotection analysis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 15, p. 12745-12751, 2003.

\_\_\_\_\_. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

\_\_\_\_\_. Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: structural and functional characterization of a vaccine candidate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1794, n. 4, p. 655-662, 2009.

RITSKES-HOITINGA, J. et al. Lowering dietary phosphorus concentrations reduces kidney calcification, but does not adversely affect growth, mineral metabolism, and bone development in growing rabbits. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 367-376, 2004.

RODRIGUEZ-PEREZ, J. et al. *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Exp. Parasitol.**, v. 74, p. 400-407, 1992.

SAMUELSON, J.C. et al. “*Schistosoma mansoni*: post-transformational surface changes in schistosomula grown in vitro and in mice”. **Experimental Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 369-383, 1980.

SANTOS, R. L.; GUEDES, R. M. C. Sistema respiratório. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. (Org.). **Patologia Veterinária**. 1ed. São Paulo: Roca, 2011. v. 1, cap. 1, p. 1-50.

SCAPIN, M. et al. Preliminary studies with *Schistosoma mansoni* saline extract induction protection in rabbits against challenge infection. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 22, p. 164-172, 1980.

SCHALL, V. et al. **Os caminhos da esquistossomose dentro do nosso corpo: parte 1.** Belo Horizonte: Instituto René Rachou, 2007. (Série Esquistossomose, n. 8)

SERABIAN M. A.; PILARO A. M. Safety assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals: ICH and beyond. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 27-31, 1999.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento.** São Paulo: ed. McGraw-Hill do Brasil, 1975.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695-700, 1965.

\_\_\_\_\_. Immunity in schistosomiasis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.160, p. 826, 1969.

SPITHILL, T. W., SMOOKER, P. M., COPERMAN, D. B. In Fascioliasis. DALTON, J. P. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. Oxford: CAB International; 1999. p. 465-525.

STEVENS, K. R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. In: HAYES, A. W. **Principles and Methods of Toxicology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 673-695.

TARRAB-HAZDAI, R., SCHECHTMAN, D., ARNON, R. Synthesis and characterization of a protective peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*. **Inf. Immun.**,v. 66, p. 4526-4530, 1998.

TENDLER, M. **Vacina Contra Esquistossomose: Sm14**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2009. (Brochura do Investigador)

TENDLER, M. et al. Immunogenic and protective activity of an extract of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 3, p. 275 - 283, 1982.

\_\_\_\_\_. *Schistosoma mansoni*: comparative evaluation of different routes of experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 27, n. 3, p. 111-114, 1985.

\_\_\_\_\_. *Schistosoma mansoni*: vaccination with adult worm antigens. **Int. J. Parasitol.**, v. 16, p. 347-352, 1986.

\_\_\_\_\_. *Schistosoma mansoni*-New Zealand Rabbit Model: resistance e induced by infection followed by active immunization with protective antigen. **J. Parasitol.**, v. 77, n. 1, p. 138-141, 1991a.

\_\_\_\_\_. Vaccination in murine schistosomiasis with adult worm-derived antigens: variables influencing protection in outbred mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 21, n. 3, p. 299-306, 1991b.

\_\_\_\_\_. Vaccination in murine schistosomiasis with adult worm derived antigens-II. Protective and imune response in inbread mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. I, p. 281-286, 1992.

\_\_\_\_\_. "Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potencial basis of a multi-valent anti-helminthic vaccine?" **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 255-256, 1995.

\_\_\_\_\_. A *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, Sm14, is the pontential basis of a dual-purpose anti-helminthic vaccine. **Proc. Nat. Aca. Sci. USA**, v. 93, p. 269-273, 1996.

TENDLER, M.; SIMPSON J. G. The biotechnonology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v. 108, p. 263-266, 2008.

THAUMATURGO, N. **Imunolocalização do Sm14 em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea-Schistosomatidae), obtidos de camundongos suíços.** 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2002.

TIMANOVA-ATANASOVA, A. et al. Fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*: purification and binding characteristics. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 6, n. 11, 2003.

VILAR, M. M. **Vacinação experimental na esquistossomose mansônica: estudo de proteção em modelo murino.** 1996. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.

\_\_\_\_\_. **Delineamentos e parâmetros experimentais dos ensaios de vacinação com Sm14 como base para uma vacina anti-helmíntica multivalente.** 2000. 74 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000.

VILAR, M. M. et al. An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. **Vaccine**, v. 22, n. 1, p. 137-144, 2003.

VON LICHTENBERG, F. Consequences of infections with schistosomes. In ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. **The biology of schistosomes: from genes to latrines.** London: Academic Press, 1987. p. 185 - 232.

WHO. **Schistosomiasis.** Geneva, [2011a]. Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: 08 aug. 2011.

\_\_\_\_\_. Schistosomiasis: number of people treated in 2009. **Weekly epidemiological record.** v.86. n.9, p. 73-80, 2011b. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2011/wer8609/en/index.html>>. Acesso em: 08 aug. 2011.

\_\_\_\_\_. Expert Committee. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 912, p. 1-57, 2002.

\_\_\_\_\_. **WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines.** Geneva, [2003]. Disponível em: <[http://www.who.int/biologicals/publications/nonclinical\\_evaluation\\_vaccines\\_nov\\_2003.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/nonclinical_evaluation_vaccines_nov_2003.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2011.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Avaliação do nível de estresse e aspecto físico dos coelhos



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**PAVILHÃO CARDOSO FONTES**

Mês: Março

**Aspecto Físico (AF)**

Muito bom ++++

Bom +++

Regular ++

Ruim +

**Nível de stress (NS)**

Alto ++++

Moderado +++

Pouco ++

Nenhum +

| Dia/<br>Parâmetros | 975  |    | 976  |    | 977 |    | 981  |    | 982  |    | 983  |    | 978  |    | 979  |    | 980  |    | 984  |    | 985  |    | 986  |    | Resp. |   |   |
|--------------------|------|----|------|----|-----|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|-------|---|---|
|                    | AF   | NS | AF   | NS | AF  | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | AF   | NS | M     | T |   |
| 01                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 02                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 03                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 04                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 05                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 06                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 07                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 08                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 09                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 10                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 11                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 12                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 13                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 14                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 15                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 16                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 17                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 18                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 19                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 20                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 21                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 22                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 23                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 24                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 25                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 26                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 27                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 28                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |
| 29                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 30                 | —    | —  | —    | —  | —   | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —    | —  | —     | — | — |
| 31                 | ++++ | +  | ++++ | +  | —   | —  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | ++++ | +  | —     | — | — |

( ) Coelho 977 do grupo A (Sm14Pp+GLA) sacrificado após sofrer fratura da coluna lombar.