

Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas  
Laboratório de Imunopatologia

**"Perfil de Citocinas, Linfócitos T e Níveis de Óxido Nítrico em Cães  
Imunizados com as Vacinas LBSap e LBSapSal e Submetidos ao Desafio  
Experimental com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Saliva de  
*Lutzomyia longipalpis*"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como  
parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia  
Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti  
Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

**Lucilene Aparecida Resende**

Ouro Preto

2011

**"Perfil de Citocinas, Linfócitos T e Níveis de Óxido Nítrico em Cães  
Imunizados com as Vacinas LBSap e LBSapSal e Submetidos ao Desafio  
Experimental com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Saliva de  
*Lutzomyia longipalpis*"**

**Lucilene Aparecida Resende**

*Colaboradores:*

Prof. Dr. Nelder F. Gontijo<sup>I</sup>

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara<sup>II</sup>

Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira<sup>III</sup>

Dr. Olindo Assis Martins Filho<sup>IV</sup>

Dra. Andrea Teixeira Carvalho<sup>IV</sup>

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta de Lana<sup>V</sup>

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Martins Carneiro<sup>VI</sup>

Ms. Bruno Mendes Roatt<sup>VI</sup>

Ms. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares<sup>VI</sup>

I - Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

II - Laboratório de Leishmanioses e Vacinas, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

III - Laboratório de Imunologia Celular e Molecular - IRR - Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

IV - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

V - Laboratório de Doença de Chagas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

VI - Laboratório de Imunopatologia - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

À minha mãe, Fátima; meu pai,  
Francisco (*in memoriam*) e meu esposo,  
Cristiano.

*“Viver é acalantar sonhos e esperanças,  
fazendo da fé a nossa inspiração maior.  
É buscar nas pequenas coisas, um  
grande motivo para ser feliz!”*

(Mário Quintana)

## **Agradecimentos**

Primeiramente, dou graças a Deus por conceder força e coragem para que eu pudesse seguir em frente. Também agradeço a Ele por ter colocado em meu caminho estas pessoas que fazem parte de minha história:

Minha querida mãe, Fátima, exemplo de vida, de dedicação... A principal responsável pela minha formação. Jamais mediu esforços para se sacrificar em meu benefício... Sem o seu apoio incondicional, com certeza seria impossível a realização deste sonho!

Meu saudoso pai, Francisco, que hoje já não está entre nós para que eu pudesse abraçá-lo, mas foi o alicerce... Seu amor, dedicação à família e exemplo de honestidade foram fundamentais para que eu chegasse até aqui...

Ao meu amado esposo, Cristiano, agradeço por estar sempre ao meu lado apoiando, sendo companheiro... Seu amor, com certeza, tornou tudo mais fácil e prazeroso. Você é muito importante para mim!

Meus irmãos, Rodrigo e Luciana; obrigada por vocês existirem!

Minha avó, Maria José, exemplo de luta e trabalho!

Ao meu avô, Geraldo (*in memoriam*), agradeço pela solidariedade!

Aos meus tios, irmãos e irmãs de minha mãe (e também seus respectivos maridos e esposas), agradeço por sempre me ajudarem!

À minha sogra, Sãozinha; obrigada por sempre me incentivar!

À República Indiscreta, onde vivi momentos inesquecíveis, e onde conquistei verdadeiras amizades... Agradeço por sempre me acolherem!

Ao professor Rodolfo, agradeço pela orientação e pela oportunidade para a realização deste trabalho. Obrigada pelo voto de confiança que me possibilitou chegar até aqui... Serei eternamente grata, de coração! Obrigada, também, pelos ensinamentos e pelo exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa, fundamentais para que eu me sinta incentivada!

Ao professor Alexandre, co-orientador deste trabalho, agradeço pelo apoio, pelos ensinamentos...

À professora Cláudia, agradeço pelo exemplo de determinação, eficiência e profissionalismo. Obrigada por tudo!

Ao Bruno, agradeço imensamente pela ajuda na realização dos experimentos e ao longo de todo o trabalho.

À Juliana, por sempre me socorrer nos momentos de desespero... Agradeço a você pela amizade, pelos conselhos e pelo exemplo de responsabilidade e compromisso. Jamais esquecerei!

À Sandra, por sempre estar disposta a contribuir e ajudar a todos nós em nossas atividades de pesquisa.

À Denise pelas dicas relacionadas aos experimentos de dosagem de óxido nítrico.

À Nádia, Carol, Caroline, e Tânia pelo carinho e pelos momentos de conversas amigas, confidências... Vocês são inesquecíveis! Obrigada pela amizade!

À Kátia, Paula, Amanda, Caio, Rodrigo, Wendel, Samuel, Henrique, Kelvinson, Gleisiane, Jamille, Ludmila, Mariana, Aline, Nathália, Phillip, Sheler, Flávia, Fernando, Levi, Ana, agradeço pelos ensinamentos, pelas vezes que me ajudaram, pela amizade e pela companhia.

À Maria, técnica do nosso laboratório, agradeço por sua dedicação.

À todos os estudantes de iniciação científica por contribuírem nas atividades diárias do laboratório e a todos os membros do LIMP pelo agradável convívio

Aos professores e colegas da pós-graduação, pelos ensinamentos e pelos momentos compartilhados.

A Cida e Josino, secretários dos programas de pós-graduação do NUPEB, pela presteza e boa vontade em nos atender.

Aos funcionários do canil, pela ajuda na manutenção dos animais.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído e a todos que torceram por mim, fica aqui registrado o meu muito obrigada!



# Índice

Lista de tabelas.....	III
Lista de diagramas.....	IV
Lista de figuras.....	V
Lista de abreviaturas e siglas.....	VI
Resumo .....	VIII
Abstract .....	IX
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da Literatura .....</b>	<b>4</b>
2.1- Estratégias imunoproliféricas anti-Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	5
2.2- Aspectos imunológicos na LVC e biomarcadores de imunogenicidade de candidatos vacinais empregando-se o cão como modelo experimental .....	9
<b>3. Justificativa .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
4.1- Objetivo geral.....	20
4.2- Objetivos específicos .....	20
<b>5. Material e Métodos .....</b>	<b>21</b>
5.1- Animais.....	22
5.2 – Produção do antígeno vacinal, do adjuvante saponina e obtenção de glândulas salivares de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	22
5.3- Delineamento experimental .....	23
5.4- Etapas realizadas previamente:.....	28
5.4.1- Obtenção de amostras de sangue periférico.....	28
5.4.2- Cultura de células mononucleares do sangue periférico.....	28
5.4.3- Imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos circulantes e de células mononucleadas do sangue periférico estimuladas <i>in vitro</i> .....	29
5.5- Etapas realizadas por ocasião do presente estudo: .....	30
5.5.1- Avaliação parasitológica.....	30
5.5.2- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) anti-citocinas .....	31
5.5.2.1- Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4, e IL-10 .....	31
5.5.2.2- Quantificação de IL-12 e IFN- $\gamma$ .....	32
5.5.2.3- Quantificação de TGF- $\beta$ .....	32

5. 5.3- Avaliação da produção de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico.....	33
<b>5.6- Análise estatística dos dados.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1- Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-10 e TGF-<math>\beta</math> no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico antes e após o desafio com <i>L. chagasi</i> em cães imunizados com LBSap e LBSapSal.....</b>	<b>36</b>
6.1.1- Análise dos níveis de IL-4.....	36
6.1.2- Análise dos níveis de IL-10.....	40
6.1.3- Análise dos níveis de TGF- $\beta$ .....	43
<b>6.2- Avaliação dos níveis das citocinas TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math> e IL-12 no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico antes e após o desafio com <i>L. chagasi</i> em cães imunizados com LBSap e LBSapSal.....</b>	<b>46</b>
6.2.1- Análise dos níveis de TNF- $\alpha$ .....	46
6.2.2- Análise dos níveis de IL-12.....	50
6.2.3- Análise dos níveis de IFN- $\gamma$ .....	54
<b>6.3- Correlações entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos .....</b>	<b>58</b>
<b>6.4- Avaliação dos Níveis de Óxido Nítrico .....</b>	<b>63</b>
<b>6.5- Correlações entre os níveis de citocinas e óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA .....</b>	<b>66</b>
<b>6.6- Determinação da carga parasitária em medula óssea através do método <i>Leishman Donovan Units</i> (LDU).....</b>	<b>67</b>
<b>7. Discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>82</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>84</b>
<b>10. Bibliografia .....</b>	<b>86</b>

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Correlações significativas entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a vacina LBSap e seus componentes na presença de VSA ou SLcA.....61

**Tabela 2:** Correlações significativas entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a vacina LBSapSal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA.....62

**Tabela 3:** Correlações significativas entre os níveis de citocinas e óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA.....67

**Tabela 4:** Avaliação parasitológica de cães vacinados com LBSap e LBSapSal e desafiados com *L. chagasi* através de LDU 885dpd .....68

## Lista de diagramas

- Diagrama 1:** Esquema do delineamento experimental utilizado na avaliação de cães controle (C) e de cães submetidos a imunizações com antígenos de *L. braziliensis* (LB), saponina (Sap), antígeno de *L. braziliensis* + saponina (LBSap), saliva de *L. longipalpis* (Sal), antígeno de *L. braziliensis* + saliva de *L. longipalpis* (LBSal) e antígeno de *L. braziliensis* + saponina + saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal).....26
- Diagrama 2:** Esquema das etapas experimentais realizadas previamente e etapas realizadas por ocasião do presente trabalho.....27

## Lista de figuras

- Figura 1:** Perfil de IL-4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....38
- Figura 2:** Perfil de IL-4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....39
- Figura 3:** Perfil de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....41
- Figura 4:** Perfil de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....42
- Figura 5:** Perfil de TGF- $\beta$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....44
- Figura 6:** Perfil de TGF- $\beta$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....45
- Figura 7:** Perfil de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....48
- Figura 8:** Perfil de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....49
- Figura 9:** Perfil de IL-12 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....52
- Figura 10:** Perfil de IL-12 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....53
- Figura 11:** Perfil de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....56
- Figura 12:** Perfil de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....57
- Figura 13:** Níveis de óxido nítrico avaliado em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....64
- Figura 14:** Níveis de óxido nítrico avaliado em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. .....65

## Lista de abreviaturas e siglas

% - percentual	ICB - Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
Ac- anticorpo	ID - via intradérmica de inoculação
Ag - Antígeno	IFN- $\gamma$ - Interferon-gama
APC - Células apresentadoras de antígeno	Ig - Imunoglobulina
BALB/c - camundongos susceptíveis à infecção por <i>L. major</i>	IgA- Imunoglobulina da classe A
BCG - <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	IgE- Imunoglobulina da classe E
C57BL/6 - camundongos resistentes à infecção por <i>L. major</i>	IgG - Imunoglobulina da classe G
CD – <i>Cluster of differentiation</i>	IgG1- Imunoglobulina da subclasse G1
CD21 - Marcador de superfície celular de linfócitos B	IgG2- Imunoglobulina da subclasse G2
CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores	IgM- Imunoglobulina da classe M
CD5 - Marcador de superfície celular de linfócitos T	IL-10 - Interleucina 10
CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores	IL-12 – Interleucina 12
CMSP- Células mononucleares do sangue periférico	IL-2 - Interleucina 2
DPD- Dias pós desafio	IL-4 - Interleucina 4
EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio	iNOS- Óxido nítrico sintetase induzível
ELISA - <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	IRR – Instituto René Rachou – Belo Horizonte - Minas Gerais
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro – RJ	LB - linfócitos B
FITC - Isotiocianato de fluoresceína	LBSap- Vacina anti-LVC
	LBSapSal- Protótipo de vacina anti-LVC
	LDU- <i>Leishman Donovan Units</i>
	Leishmune® - Vacina anti-LVC
	Leish-Tec® - Vacina anti-LVC
	Leishvacin® - Vacina anti-LTA
	LT - linfócitos T
	LV - Leishmaniose Visceral
	LVC - Leishmaniose Visceral Canina
	MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento

MHC-I – complexo de  
histocompatibilidade principal de classe I

MHC-II - complexo de  
histocompatibilidade principal de classe  
II

MS- Ministério da Saúde

NO - óxido nítrico

°C - graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate buffer saline*

TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento  
transformante tipo beta

Th - Células T *helper*

Th1 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do  
padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do  
padrão 2 de citocinas

TNF-  $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral tipo  
alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas  
Gerais

WHO - World Health Organization

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

## Resumo

Os cães representam o reservatório doméstico mais importante de *L. chagasi* (sin. *L. infantum*), e uma vacina contra leishmaniose visceral canina (LVC) pode ser uma importante ferramenta para o controle da leishmaniose visceral humana (LV). Além disso, para a obtenção de uma vacina efetiva, é fundamental o entendimento de eventos relacionados à imunogenicidade após a vacinação e desafio com o agente etiológico para que seja definida a resposta imune associada à proteção contra a infecção por *Leishmania*. Assim, neste trabalho foi verificada a imunogenicidade e proteção conferida pela vacinação de cães contra LVC com os imunobiológicos LBSap e LBSapSal. Desta forma, trinta e cinco cães sem raça definida foram distribuídos em sete grupos experimentais, entre os quais: (i) grupo controle C ( $n = 5$ ) que recebeu 1 mL de salina estéril a 0,9%; (ii) grupo LB ( $n = 5$ ) que recebeu 600  $\mu\text{g}$  de proteína de *Leishmania braziliensis* em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (iii) grupo Sap ( $n = 5$ ) que recebeu 1 mg de saponina em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (iv) grupo LBSap ( $n = 5$ ) que recebeu 600  $\mu\text{g}$  de proteína de *L. braziliensis* associado a 1 mg de saponina em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (v) grupo Sal ( $n = 5$ ) que recebeu extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (SGE) equivalente ao conteúdo de 5 ácidos da glândula salivar em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (vi) grupo LBSal ( $n = 5$ ) que recebeu 600  $\mu\text{g}$  de promastigotas de *L. braziliensis* associado ao SGE em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (vii) grupo LBSapSal ( $n = 5$ ) que recebeu 600  $\mu\text{g}$  de promastigotas de *L. braziliensis* associado a 1 mg de saponina e ao SGE em 1 mL de salina estéril a 0,9%. Cada animal recebeu três aplicações subcutâneas no flanco esquerdo em intervalos de quatro semanas. Posteriormente, os cães foram infectados por via intradérmica com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* na presença de saliva de *L. longipalpis*, sendo avaliados 90 e 885 dias pós desafio. Os níveis de óxido nítrico (NO) e citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ) foram avaliados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). O grupo LBSap apresentou altos níveis de IL-4 (T3 e T90dpd), IL-10 (885dpd) e baixos níveis de TGF- $\beta$  (885dpd) após estímulo com antígenos de *Leishmania*. Além disso, o grupo LBSapSal apresentou baixos níveis de IL-4 (90dpd) e TGF- $\beta$  (90 e 885dpd) após estímulo com antígeno de *Leishmania*. Adicionalmente, altos níveis de IL-12 foram observados nos grupos LBSap e LBSapSal (T3, 90dpd e 885dpd). Da mesma forma, aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  foram observados nos grupos LBSap (T3, 90dpd e 885dpd) e LBSapSal (T3, 90dpd e 885dpd). O perfil de citocinas sugere que as vacinas LBSap e LBSapSal podem conferir imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania*. Os resultados obtidos a partir da análise dos níveis de NO confirmaram a hipótese de que as estas vacinas induzem um perfil de resistência contra a infecção por *Leishmania*. Os principais resultados do presente estudo apontam para uma forte imunogenicidade induzida pela vacinação de cães com LBSap e LBSapSal e submetidos ao desafio experimental com *L. chagasi*, indicando uma ação destes imunobiológicos compatível com controle do parasito em cães. Novos estudos de avaliação da carga parasitária em medula óssea através da PCR em tempo real podem fornecer importantes informações para um melhor entendimento da eficácia das vacinas LBSap e LBSapSal.



## Abstract

Dogs represent the most important domestic reservoirs of *L. chagasi* (syn. *L. infantum*), and a vaccine against canine visceral leishmaniasis (CVL) would be an important tool in the control of human visceral leishmaniasis (VL) by decreasing dramatically the infection pressure of *L. chagasi/L. infantum*. Moreover, to obtain a successful vaccine, the understanding of immunogenicity mechanisms involved after vaccination and challenge is crucial to define the protective responses associated against *Leishmania* infection. Thus, in this work it was investigated the immunogenicity and protective effect of LBSap and LBSapSal vaccination in dogs. In this sense, thirty five mongrel dogs were treated within seven experimental groups as follow: (i) control group C ( $n = 5$ ) received 1 mL of sterile 0.9% saline; (ii) LB group ( $n = 5$ ) received 600  $\mu\text{g}$  of *Leishmania braziliensis* promastigote protein in 1 mL sterile 0.9% saline; (iii) Sap group ( $n = 5$ ) received 1 mg of saponin in 1 mL sterile 0.9% saline; (iv) LBSap group ( $n = 5$ ) received 600  $\mu\text{g}$  of *L. braziliensis* promastigote protein and 1 mg of saponin in 1 mL sterile 0.9% saline; (v) Sal group ( $n = 5$ ) received sand fly gland extract (SGE) prepared from 5 acini of salivary glands of *Lutzomyia longipalpis* in 1 mL sterile 0.9% saline; (vi) LBSal group ( $n = 5$ ) received 600  $\mu\text{g}$  of *L. braziliensis* promastigote protein plus SGE in 1 mL sterile 0.9% saline; and (vii) the LBSapSal group ( $n = 5$ ) received 600  $\mu\text{g}$  of *L. braziliensis* promastigote protein plus 1 mg of saponin together with SGE in 1 mL sterile 0.9% saline. Each animal received three subcutaneous injections in the right flank at intervals of 4 weeks. Afterwards, the dogs were intradermally infected with  $1 \times 10^7$  late-log-phase promastigotes of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in the presence of sand fly saliva of *L. longipalpis* and follow-up at 90 and 885 days post challenge (dpc). Nitric oxide (NO) levels (determined as nitrite) and cytokines (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ) were evaluated in culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by vaccine soluble antigen (VSA) or soluble *Leishmania chagasi* antigen (SLcA). LBSap group displayed higher levels of IL-4 (T3 and 90dpi), IL-10 (885dpi) and lower levels of TGF- $\beta$  (885dpi) following *Leishmania* stimulation. Moreover, LBSapSal group presented lower levels of IL-4 (90dpi) and TGF- $\beta$  (90 and 885dpi) after *Leishmania* stimulation. In addition, higher levels of IL-12 were observed in LBSap and LBSapSal groups (T3, 90 and 885dpi). Likewise, increased levels of IFN- $\gamma$  were related to LBSap (T3, 90 and 885dpi) and LBSapSal (T3, 90 and 885dpi) groups. The cytokines profile suggest that LBSap and LBSapSal vaccine have potential protective immunity against *Leishmania* infection. The results obtained from the analysis of NO levels confirmed the hypothesis that these vaccines induce a potential resistance profile against *Leishmania* infection. In conclusion, the major findings in the present study point to a strong immunogenicity elicited when dogs were vaccinated with LBSap or LBSapSal and submitted to experimental challenge indicating a compatible action of this immunobiological with the effective control of the parasitism in dogs. Further studies on bone marrow parasitism using real time PCR may provide important information that will lead to a better understanding on LBSap and LBSapSal efficacies.

## **1. Introdução**

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Desjeux, 2004; Schriefer *et al.*, 2008), que são transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas hematófagas dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. No hospedeiro vertebrado, os parasitos invadem os fagócitos e, dependendo da espécie de *Leishmania*, induzem um espectro de doenças, variando de lesões cutâneas que podem ser auto-resolutivas até a forma visceral grave que pode ser letal, caso não tratada (Lainson & Shaw, 1987; WHO, 2011).

Anualmente, cerca de dois milhões de pessoas adquirem Leishmaniose em diferentes regiões do mundo (WHO, 2011). No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV), que tem como agente etiológico a *Leishmania chagasi* (sinonímia *Leishmania infantum*), é amplamente distribuída e tem sido notificada em, pelo menos, 12 estados, sendo que os focos mais endêmicos ocorrem na região Nordeste (MS, 2006). É interessante observar que, com a urbanização, tem ocorrido uma adaptação do ciclo de transmissão no ambiente peridomiciliar, levando a um aumento do número de casos relatados de LV em todo o mundo. Sendo assim, ressalta-se o importante papel dos cães como reservatório no ciclo epidemiológico, favorecendo a transmissão do protozoário a humanos e a outros cães, visto que animais infectados (Deane & Deane, 1955), mesmo sem qualquer sinal clínico da doença, podem infectar flebotomíneos (Molina *et al.*, 1994; da Costa-Val *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o controle da LV preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), baseia-se em um tripé de ações cujos pilares são a eutanásia dos cães infectados, o tratamento de indivíduos doentes e o uso de piretróides no domicílio e peridomicílio para combate do inseto vetor (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Entretanto, uma vigilância epidemiológica intensa e permanente deve ser mantida para que essas medidas de controle possam lograr sucesso. Um grande problema no programa de controle da LV está no uso de fármacos destinados ao tratamento de casos humanos para tratamento da doença canina, já que independentemente do protocolo terapêutico, não é possível obter cura parasitológica nestes animais (Noli & Auxilia, 2005; MS, 2006). Além disso, o tratamento incorreto na LVC pode possibilitar o surgimento de cepas resistentes à fármacos utilizados para o tratamento humano e por isto o emprego da terapêutica anti-LVC não tem sido indicado, conforme parecer nº 0299/2004 da Advocacia Geral da União e de acordo com a portaria interministerial do Ministério da Saúde (nº 1.426, de 11 de julho de 2008) que proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso humanos ou não

registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Por outro lado, com a proximidade entre homem e cão na sociedade atual, o recolhimento e a eutanásia dos animais soropositivos, muitas vezes assintomáticos, torna-se cada vez mais complicado (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001).

Considerando que a quimioterapia em cães ainda não proporciona cura parasitológica (Noli & Auxilia, 2005), o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC seria a melhor alternativa para combater a crescente expansão da doença podendo contribuir de forma efetiva nos programas de controle da LV (Hommel *et al.*, 1995, Gradoni, 2001, Mauel, 2002, Desjeux *et al.*, 2004, Ravindran & Ali, 2004, Reis *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento ainda não existem vacinas aprovadas pelo Ministério da Saúde que sejam comprovadamente eficazes e que possam ser empregadas no âmbito nacional do programa de controle da leishmaniose visceral canina (PCLV) (MS, 2006).

Neste sentido, diversos pesquisadores têm se empenhado no estudo de vacinas contra a LVC. Nosso grupo desenvolveu dois novos imunobiológicos contra leishmaniose visceral canina: as vacinas LBSap (composta por antígenos de *Leishmania braziliensis* acrescido do adjuvante saponina) e LBSapSal (composta por antígenos de *Leishmania braziliensis* acrescido do adjuvante saponina e saliva de *Lutzomyia longipalpis*). Desta forma, nosso grupo de pesquisa tem concentrado esforços em estudos para favorecer a identificação de eventos relacionados à imunogenicidade pós-vacinal e/ou pós desafio com *L. chagasi*, para triagem de candidatos vacinais contra LVC (Roatt, 2010; Aguiar-Soares, 2010).

## **2. Revisão da Literatura**

## 2.1- Estratégias imunoproláticas anti-Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Os imunobiológicos empregados em intervenções vacinais na LVC podem ser agrupados em três classes, no que se refere ao processo de produção. A primeira geração teve início com os primeiros estudos de vacinação contra a leishmaniose tegumentar humana por Salles-Gomes (1939) e Pessoa & Pestana (1940) e se estende até os dias atuais, sendo incorporada em ensaios clínicos vacinais anti-LVC (Mayrink *et al.*, 1996; Lasri, *et al.*, 1999; Giunchetti *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008; Giunchetti *et al.*, 2008a,b; Araújo *et al.*, 2009). Em vacinas de primeira geração, as preparações antigênicas são tipicamente constituídas por antígenos brutos, obtidos através de técnicas de atenuação ou fixação dos agentes etiológicos de interesse. Após os avanços gerados pelas técnicas bioquímicas de purificação de proteínas e técnicas de biologia molecular, a partir dos anos 90, iniciaram-se os estudos de vacinas de segunda geração, constituídas por subunidades definidas, denominadas antígenos recombinantes. As vacinas de segunda geração incluem bactérias ou vírus recombinantes, além de utilização de vacinas vivas, com *Leishmania* geneticamente modificada (Santos *et al.* 2002). Com o avanço dos estudos genômicos e pós-genômicos surgiram as vacinas de terceira geração (vacinas de DNA), constituídas de genes que codificam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Dentre os inúmeros trabalhos que buscam o desenvolvimento de uma vacina de primeira geração contra a LVC no Brasil, pode ser destacado o desenvolvimento da Leishvacin por Mayrink e colaboradores nas décadas de 1970 e 1980. Esta vacina, composta por antígeno de promastigotas sonicadas, era inicialmente composta por 5 cepas de *Leishmania*, sendo mais tarde simplificada para apenas uma cepa com a finalidade de padronizar a produção do antígeno vacinal (Mayrink *et al.*, 1985; Mayrink *et al.*, 1986). Em 1996, foi realizado um estudo onde cães mantidos em canil foram imunizados com antígeno bruto de *L. braziliensis* associado ao adjuvante BCG (Bacillus Calmette-Guérin) e desafiados com *L. chagasi*. Os resultados mostraram proteção de 90% dos animais vacinados, após 470 dias de acompanhamento (Mayrink *et al.*, 1996). Considerando estes promissores resultados, um novo ensaio clínico vacinal duplo-cego randomizado (fase III) foi realizado em cães de área endêmica para LV, no município de Montes Claros-MG. Porém, os resultados do teste de eficácia da vacinação não demonstraram o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *Leishmania* na população

vacinada em relação ao grupo controle (Genaro *et al.*, 1996). Em outro estudo supervisionado pelo professor Genaro, uma nova composição vacinal, agora bivalente, constituída por extrato bruto de cepas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. braziliensis* (MCAN/BR/1972/C348) associado ao BCG como adjuvante foi testada em cães imunizados e desafiados com *L. chagasi*. Os resultados mostraram que não houve proteção dos animais vacinados frente ao desafio com *L. chagasi* (Fujiwara *et al.*, 2005). Posteriormente, o Prof. Alexandre Reis e seu grupo de pesquisa, prosseguiram nestes estudos buscando o aprimoramento da composição vacinal destes imunobiológicos, pois ficou evidente a necessidade de se realizar ajustes, visando o aumento da imunogenicidade, favorecendo a proteção dos animais. É importante salientar que os imunobiológicos estudados neste trabalho, LBSap e LBSapSal, são vacinas de primeira geração compostas por antígenos brutos de *L. braziliensis*. Este tipo de antígeno apresenta como vantagens a estabilidade, a antigenicidade, a segurança e o baixo custo para produção (Giunchetti, 2007). Estudos que buscam avaliar biomarcadores de imunogenicidade nessas vacinas têm demonstrando que esses imunobiológicos são capazes de induzir aumento de linfócitos T ( $CD5^+$ ,  $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) e linfócitos B ( $CD21^+$ ) circulantes, bem como de linfócitos T  $CD8^+$  e T  $CD4^+$  *Leishmania*-específicos (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a; Roatt, 2010; Aguiar-Soares, 2010). Além disto, as vacinas LBSap e LBSapSal apresentam-se inócuas e seguras para a administração sem causar lesões ulcerativas no local do inóculo (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Vitoriano-Souza, 2008).

Em relação aos candidatos a vacinas contra LVC de segunda geração, podem ser citados aqueles constituídos por antígenos recombinantes. Em 2005, Fujiwara *et al.*, avaliaram aspectos da imunidade celular de cães submetidos a diferentes esquemas de vacinação empregando os imunógenos compostos pelas proteínas LmSTI1 descrito por Webb *et al.* (1996), MAPS/TSA descrito por Webb *et al.* (1998) e LeIF descrito por Skeiky *et al.* (1998). Foi demonstrado que embora estes antígenos tenham sido capazes de induzir um estado de imunogenicidade em cães vacinados, eles não ofereceram proteção após o desafio experimental com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* por via endovenosa.

Outro candidato vacinal contra LVC, composto por antígenos secretados/excretados de *L. infantum* (LiESAp) associado ao adjuvante Dipeptídeo Muramílico (MDP), foi desenvolvido na França. Foram feitos estudos em canil, onde os animais foram imunizados e desafiados com promastigotas de *L. infantum* apresentaram aumento dos níveis de

proliferação de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno vacinal, bem como aumento dos níveis de óxido nítrico e IFN- $\gamma$  em cães vacinados (Lemesre *et al.*, 2005). Esta vacina prosseguiu para um ensaio de campo de fase III evidenciando envolvimento de resposta celular e eficácia de 92% em cães vacinados após 2 anos de avaliação (Lemesre *et al.*, 2007).

Também merece destaque a vacina de segunda geração contra a LVC, conhecida por Leishmune<sup>®</sup>, sendo esta já licenciada pelo Ministério da Agricultura e disponível para comercialização. Esta vacina foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Dra. Clarisa Palatnik de Sousa, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A vacina Leishmune<sup>®</sup> é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *L. donovani* associado ao adjuvante saponina. O antígeno de FML foi descrito em 1989 e isolado de promastigotas de *L. donovani* (Palatnik *et al.*, 1989). Essa fração glicoprotéica, que contém fucose e manose, foi denominada FML. Trata-se de um complexo glicoprotéico que inibe fortemente a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* (Palatnik *et al.*, 1989; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1993) de forma espécie-específica (Palatnik *et al.*, 1990). O potencial protetor do FML como vacina em associação com adjuvante saponina foi testado em ensaios de fase I e II em camundongos BALB/c, *Swiss* e hamsters CB (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1994a; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1994b). Em hamsters, foi observado aumento de anticorpos anti-FML de 97%, aumento da proliferação de esplenócitos *in vitro* de 76% e redução de 90% da carga parasitária no baço (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1994b). Já o estudo em camundongos BALB/c demonstrou aumento de anticorpos anti-FML de 89,1%, aumento da proliferação de esplenócitos *in vitro* de 79,1% e redução de 84% da carga parasitária no fígado (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1994a). O FML foi também usado em combinação com saponinas, IL-12 e BCG, na vacinação de camundongos *Swiss* (Santos *et al.*, 2002). Foi observado aumento significativo e específico dos anticorpos anti-FML, IgG e IgM, após utilização de todos os adjuvantes. Além disso, a utilização como adjuvante de saponinas ou IL-12 induziu aumento de IgG1, IgG2a, IgG2b e hipersensibilidade tardia contra o lisado de *L. donovani* (Intradermorreação-IDR). Provavelmente, a intensa resposta produzida pela administração da saponina, induzindo proteção específica, orientou o uso das saponinas como promissores adjuvantes em vacinas contra LV.

Finalmente, também se encontra entre os antígenos que têm sido avaliados, a proteína recombinante A2, constituinte da vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, associado ao adjuvante saponina.



Essa vacina, desenvolvida por pesquisadores da UFMG, foi licenciada pelo MAPA, e encontra-se disponível no mercado brasileiro. As propriedades imunogênicas do antígeno A2 foram demonstradas em testes de fase I e II. Em camundongos BALB/c, foi observada capacidade de conferir proteção contra a infecção experimental com *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, onde a proteção foi associada à elevada resposta imune Th1, específica ao parasito e caracterizada pela grande produção de IFN- $\gamma$  (Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007). Em cães, foi observado que a vacinação induziu a produção de altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2, com aumento na produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de CMSP (Fernandes *et al.*, 2008).

Como alternativa inovadora na busca de imunobiológicos anti-LVC estão os candidatos vacinais de terceira geração. Os antígenos mais estudados foram aqueles anteriormente testados como proteínas recombinantes, sendo que a maioria deles foi testada como vacinas individuais e alguns, como a combinação de genes ou como *prime-boost* heterólogo (HPB), que envolve uma injeção da vacina de DNA seguido pela injeção da proteína recombinante ou vírus expressando a proteína recombinante. A maioria dos estudos foi realizada utilizando camundongos como modelo experimental e em alguns, o hamster e cães (Palatnik-de-Sousa, 2008). Entre os estudos com vacinas de DNA que utilizaram o cão como modelo experimental pode ser citado o trabalho de Rafati *et al.* (2005), onde foi utilizada uma combinação para imunização com DNA e proteínas cisteína proteinases tipo I (CPB) e tipo II (CPA) de *L. infantum*. Os animais apresentaram proliferação celular antígeno-específica, altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e apenas 3 de 10 animais apresentaram resultados parasitológicos positivos após um ano do desafio experimental intravenoso com *L. infantum*. Em outro estudo, Rodríguez-Cortés *et al.* (2007) utilizaram uma vacina de DNA expressando quatro proteínas de *L. infantum* (KMP-II, TRYPLACK e GP63), onde não foi observada proteção contra o desafio experimental por *L. infantum* em cães. Ramos *et al.* (2008), em um estudo com vacina de DNA, expressando apenas a proteína LACK de *L. infantum*, observaram, após 290 dias do desafio experimental intravenoso, parasitismo hepático semelhante entre os grupos imunizados e não imunizados. Sendo assim, observa-se que a imunização com vacinas de terceira geração oferece resultados promissores, porém novos estudos são fundamentais para obtenção de maiores taxas de proteção para o modelo canino (Ramiro *et al.*, 2003; Rafati *et al.*, 2005; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007).

## 2.2- Aspectos imunológicos na LVC e biomarcadores de imunogenicidade de candidatos vacinais empregando-se o cão como modelo experimental

Devido ao importante papel do cão como o principal reservatório do protozoário na LV (Moreno & Alvar, 2002), surgiu no ambiente científico um forte interesse em compreender a resposta imune na LVC, visando encontrar antígenos de *Leishmania* capazes de levar à proteção e, conseqüentemente, ao controle da doença. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos relacionados à resposta imune celular e humoral é de fundamental importância para a compreensão de eventos relacionados a resistência ou susceptibilidade à infecção (Gradoni, 2001, Reis *et al.*, 2010). Assim, o conhecimento desses biomarcadores tem sido considerado como pré-requisito para o estudo de vacinas contra LVC (Reis *et al.*, 2010). Além disso, a busca por um padrão de resposta imune que pudesse estar relacionado a resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, como já descrito no modelo murino (Mosmann *et al.*, 1986), tem sido alvo de importantes estudos utilizando como modelo as formas clínicas assintomática, oligossintomática e sintomática da LVC (Pinelli *et al.* 1994; Pinelli *et al.* 1995; Reis *et al.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006b; Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b, Reis *et al.*, 2009; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Lage *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009). Os resultados obtidos nestes estudos incentivaram, na atualidade, o desenvolvimento e a avaliação de ensaios vacinais (Fase I, II e III), buscando identificar biomarcadores de imunogenicidade em cães vacinados.

Uma das estratégias na identificação de biomarcadores de imunogenicidade em vacinas contra LVC consiste no estudo do perfil de citocinas do tipo 1, tipo 2, bem como citocinas imunomodulatórias. Essa estratégia permite identificar de forma global o perfil de citocinas buscando compreender a resposta imune em cães submetidos à imunização com imunobiológicos anti-LVC, favorecendo a busca mais racional de candidatos vacinais (Reis *et al.*, 2010).

Neste sentido, um importante imunomediador no estabelecimento de imunidade protetora contra a LV é a citocina pró-inflamatória clássica da resposta tipo 1, o IFN- $\gamma$ . Esta citocina é produzida por células T, dendríticas, macrófagos e “natural killer” (NK) e tem a função de induzir a síntese de óxido nítrico, ativando funções microbidas (Trinchieri *et al.*, 1993; Reiner *et al.*, 1995). O óxido nítrico produzido a partir do precursor L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em macrófagos,

é uma das moléculas mais importantes responsáveis pela morte de parasitos intracelulares como os do gênero *Leishmania* (Bogdan, 2001; Sisto *et al.*, 2001). Sendo assim, IFN- $\gamma$  controla o crescimento de *Leishmania sp.* em macrófagos murinos e humanos, limitando a progressão da doença (Murray *et al.*, 1992). Em cães, um estudo desenvolvido por Andrade *et al.* (1999) com animais naturalmente infectados com *L. chagasi* demonstrou que a produção de IFN- $\gamma$  foi detectada no sobrenadante de CMSP apenas em animais assintomáticos e oligossintomáticos, assim como a resposta linfoproliferativa para *Leishmania*. Em outro estudo desenvolvido por Carrillo *et al.* (2007) em cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, a expressão de citocinas, verificada pela PCR em tempo real, permitiu detectar altos níveis de IFN- $\gamma$  expressos por CMSP de cães assintomáticos após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania* quando comparados aos animais sintomáticos e controle não infectados. Dessa forma, alguns dados obtidos no modelo canino de LV são coerentes com o que ocorre no modelo murino, onde a expressão de IFN- $\gamma$  é associada ao controle da infecção (Heinzel *et al.*, 1989; Squires *et al.*, 1989). Porém, Lage *et al.* (2007) verificaram correlação positiva na LVC entre a carga parasitária esplênica e os níveis mRNA de IFN- $\gamma$  desse tecido. Assim, o nível de IFN- $\gamma$ , quando analisado isoladamente, não representa um bom indicador de resistência à infecção conforme também já verificado por outros autores (Karp *et al.*, 1993; Chamizo; Lage *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2010), e por este motivo não deve ser avaliado isoladamente em ensaios vacinais contra LVC (Reis *et al.*, 2010).

Juntamente com IFN- $\gamma$ , IL-12 tem sido apontada como importante citocina no controle da infecção por *Leishmania*. A IL-12 é uma citocina produzida por células do sistema fagocitário mononuclear que geralmente precede e induz a produção de IFN- $\gamma$  (Brunda, 1994). Na LVC, a relevância da IL-12 foi demonstrada no trabalho desenvolvido por Strauss-Ayali *et al.* (2005), com cães experimentalmente e naturalmente infectados por *L. infantum*. Neste estudo, foi verificado que as CMSP estimuladas com IL-12 exógeno, eram capazes de reverter um estado de aparente anergia típica da doença, favorecendo o aumento da expressão e produção de IFN- $\gamma$  em todos os cães infectados com *L. infantum*. Dessa forma, foi observado que a IL-12 favorece o estabelecimento de uma resposta imune do tipo 1, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  (Strauss-Ayali *et al.* 2005).

Outra importante citocina pro-inflamatória (ou tipo 1) envolvida na resistência à infecção por *Leishmania* é TNF- $\alpha$ . Esta citocina é produzida por macrófagos, células T e

células NK e age, juntamente com o IFN- $\gamma$ , induzindo a produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, a morte de amastigotas no interior de macrófagos (Liew *et al.*, 1993). Dentre os estudos existentes em LVC, podem ser destacados os trabalhos pioneiros de Pinelli *et al.* (1994a), Pinelli *et al.* (1994b), Pinelli *et al.* (1995) e Pinelli *et al.* (1999) onde foi estabelecida uma associação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  com um perfil de resistência, sendo evidenciada a relação direta entre o grau de comprometimento clínico e a alteração da resposta imune celular.

Dentre as citocinas associadas à progressão da infecção, pode ser citada TGF- $\beta$ . Esta é uma citocina produzida por linfócitos B e T, além de células NK e macrófagos ativadas, que suprime a capacidade microbicida de macrófagos, inibindo sua capacidade de controlar o crescimento do parasito intracelular (Barral *et al.*, 1993). Neste sentido, foi descrito que TGF- $\beta$  inibe o desenvolvimento de resposta do tipo 1 pelas citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , favorecendo a infecção por *Leishmania* (Schimitt *et al.*;1994). Além disto, alguns estudos mostram que TGF- $\beta$  inibe a síntese de TNF- $\alpha$ , alterando a função dos macrófagos e a produção de óxido nítrico (Vodovotz, *et al.*,1993; Wahl, 1994; Omer, *et al.*, 2000). Estudos de infecção experimental por *L. donovani* em hamsters e *L. chagasi* em camundongos mostraram aumento da produção de TGF- $\beta$  em cultura de macrófagos (Rodrigues *et al.*,1998; Gantt *et al.*, 2003). Corrêa *et al.* (2007) ao avaliarem a produção de TGF- $\beta$ , IL-10 e IFN- $\gamma$ , em extratos de baço e fígado de cães assintomáticos e sintomáticos, verificaram maior produção de TGF- $\beta$  no grupo de cães assintomáticos, enquanto que IL-10 e IFN- $\gamma$  apresentaram altos níveis em ambos os grupos de cães. Em outro estudo realizado por Alves *et al.* (2009) na LVC, avaliando a expressão de citocinas em linfonodos associado com carga parasitária e forma clínica da doença em animais naturalmente infectados por *L. chagasi*, foi observada a ocorrência de alta expressão de TGF- $\beta$  e IL-10 associadas ao aumento da carga parasitária em cães sintomáticos, sugerindo o papel destas citocinas na progressão da doença. Desta forma, estes resultados sugerem que TGF- $\beta$  estaria relacionada à progressão da doença na LVC.

Outra importante citocina é a IL-10. Esta apresenta atividade regulatória e é produzida por células T e B, macrófagos, células dendríticas e epiteliais. Sua produção pode ser induzida como parte de um mecanismo homeostático para evitar danos teciduais causados por inflamação excessiva (Moore *et al.*, 2001; Mege, *et al.*, 2006). Em humanos, a associação entre aumento dos níveis de IL-10 e a gravidade da LV é evidente. Neste

sentido, na revisão realizada por Nylén e Sacks (2007) os autores relatam diversas vias que contribuem para a gravidade da doença através das ações de IL-10. Provavelmente, um dos efeitos mais danosos consiste na inibição da responsividade de macrófagos a sinais de ativação (IFN- $\gamma$ ), com conseqüente inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, culminando com a manutenção do parasitismo por espécies de *Leishmania* (Nylén e Sacks, 2007). Outra contribuição desta citocina para a patogênese da LV é o fato dela impossibilitar as funções de apresentação de antígenos por células dendríticas e macrófagos, através da inibição da expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias. Além disso, ocorre também inibição da produção de IL-12, o que pode resultar em inibição de uma resposta antígeno-específica do tipo 1. A IL-10 também pode inibir a maturação e migração de células dendríticas, além de contribuir para a apoptose de células T e aumento da sobrevivência de células B, que podem ser fonte da geração de mais IL-10. O aumento da produção de anticorpos característico da LV pode contribuir para a patogênese da doença, causando danos teciduais pela deposição de imunocomplexos, que por sua vez podem estimular monócitos e macrófagos a produzirem mais IL-10 (Nylén e Sacks, 2007).

Um dos primeiros trabalhos descritos na LVC abordando uma análise do perfil de citocinas foi o de Pinelli *et al.* (1999). Neste estudo, foi avaliada a expressão de mRNA de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 em CMSP de cães infectados por *L. infantum*. De forma interessante, este estudo evidenciou que, na ausência de sinais clínicos, todas as citocinas avaliadas foram detectadas, enquanto, na presença de sinais clínicos, apenas foi detectada expressão de IL-10 ou IL-4, sugerindo uma possível participação destas citocinas no desenvolvimento de sinais clínicos da LVC. Mais recentemente, Lage *et al.* (2007), relataram aumento da expressão de IL-10 em esplenócitos de cães com alta carga parasitária comparados aos animais com baixo e médio parasitismo na infecção natural por *L. chagasi*. Estes achados foram semelhantes aos relatados por Alves *et al.* (2009) avaliando o linfonodo na LVC. Nesse sentido, estes trabalhos apontam para um possível efeito imunossupressor da IL-10 na LVC, o que favoreceria a manutenção ou aumento do parasitismo tecidual. Por outro lado, Quinnell *et al.* (2001) relataram, em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, maior expressão de IFN- $\gamma$ , não sendo observado aumento da expressão de IL-18, IL-4 e IL-10. Dessa forma, neste estudo não foi constatado o papel imunossupressor de IL-10. De forma semelhante, Santos-Gomes *et al.* (2002) ao avaliar cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, não observaram relação entre a gravidade da doença e a expressão de IL-10.

A citocina IL-4 é produzida principalmente por linfócitos T e tem ação moduladora do sistema imune em modelo murino, regulando a secreção ou inibindo os efeitos protetores de citocinas da resposta do tipo 1 como IFN- $\gamma$  e IL-12, sendo relacionada à morbidade neste modelo (Miralles *et al.*, 1994). Da mesma forma, IL-4 parece estar relacionada à susceptibilidade na LVC. Chamizo *et al.* (2005), ao avaliarem a expressão de citocinas em CMSP de cães assintomáticos experimentalmente infectados por *L. infantum* comparados a cães não infectados, observaram que IL-4 foi detectada em níveis inferiores no grupo de cães assintomáticos. Em outro estudo, onde foi pesquisada a expressão de citocinas em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, foi observado que a expressão de IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi significativamente superior em relação aos grupos controles não infectados. Além disso, cães com alta carga parasitária apresentaram níveis de expressão de IL-4 significativamente superiores aos demais cães em estudo (Brachelente *et al.*, 2005). Já Quinnell *et al.*, (2001), em um trabalho de análise do perfil de citocinas em aspirado de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, observaram que cães sintomáticos apresentavam maiores níveis de IL-4. Desta forma, estes estudos apontam para a importância da IL-4 em favorecer o parasitismo na LVC, contribuindo para a manutenção da morbidade.

É importante ressaltar que a resistência ou susceptibilidade à infecção, em modelo murino, foi relacionada à produção de citocinas por subgrupos de células Th1 e Th2, respectivamente (Mosmann *et al.*, 1986). Porém, na LVC, essa dicotomia não é tão clara, como tem sido demonstrado em diferentes estudos, com a presença simultânea de IFN- $\gamma$  e IL-10 (Chamizo *et al.*, 2005; Lage *et al.*, 2007). Além disso, mais recentemente, foi descrito na LVC ativa um perfil misto de citocinas, com altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ , concomitante com baixa expressão de IL-12 e maior carga parasitária cutânea (Menezes-Souza *et al.*, 2010).

Além da avaliação dos níveis de citocinas, a imunofenotipagem celular também constitui um importante biomarcador indicado para compor testes para se estudar a história natural da LVC (Reis *et al.*, 2006b) ou ainda para estudos de imunogenicidade vacinal contra LVC (Reis *et al.*, 2010). Em 1997, Bourdoiseau *et al.* ao avaliarem o fenótipo celular do sangue periférico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, verificaram que cães sintomáticos apresentavam queda no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B CD21<sup>+</sup> circulantes em relação aos animais assintomáticos. Ruitenbergh *et al.*, (2001) observaram ativação de linfócitos T em CMSP de cães assintomáticos após estímulo

específico *in vitro* por antígeno de *L. infantum*, resultando na produção de IFN- $\gamma$  e indução da atividade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com consequente lise de macrófagos infectados por *Leishmania*. Por outro lado, cães sintomáticos apresentaram queda na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B CD21<sup>+</sup>, e redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antigênico-específico, sem produção significativa de IFN- $\gamma$  e, consequentemente, menor capacidade da lise de macrófagos infectados por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Outro estudo de avaliação do fenótipo de leucócitos do sangue periférico na LVC sugere que o aumento de linfócitos T (CD5<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>) e da expressão de MHC-II em linfócitos do sangue periférico consiste em importantes biomarcadores associados ao controle do parasitismo (Reis *et al.*, 2006b). Mais recentemente, Alexandre-Pires *et al.* (2010) realizaram um estudo onde foi avaliada a caracterização fenotípica de linfócitos e a expressão de MHC-II no sangue periférico, medula óssea e linfonodos de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e cães tratados. Foi observada alta frequência de linfócitos MHC-II<sup>+</sup> no grupo de cães assintomáticos e monócitos MHC-II<sup>+</sup> no grupo tratado. Estes resultados reafirmam a importância da análise da expressão de MHC-II como biomarcador indicativo de ativação celular em cães com LVC (Reis *et al.*, 2006b) ou em estudos vacinais empregando-se o cão como modelo experimental (Reis *et al.*, 2010).

Do ponto de vista da resposta humoral na LVC, alguns autores procuram associar a presença de determinado subtipo de IgG aos diferentes quadros clínicos de LVC, visando determinar marcadores sorológicos de proteção ou de progressão da doença. Dessa forma, vários estudos da infecção natural ou experimental mostraram ocorrência de ativação policlonal de linfócitos B com elevação na produção de imunoglobulinas (Abranches *et al.*, 1991; Genaro, 1993; Martinez-Moreno *et al.*, 1993; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006a,b; Giunchetti *et al.*, 2008c). Porém, a discussão entre autores, sobre a presença de uma determinada subclasse que esteja relacionada a resistência ou susceptibilidade na LVC é ainda controversa (Barbiéri, 2006; Day, 2007). Enquanto, alguns autores associam a presença de sinais clínicos de LVC a altos níveis de IgG1 (Deplazes *et al.*, 1995; Quinnell *et al.*, 2003; Iniesta *et al.*, 2005) outros relacionam o subtipo IgG2 à manifestação clínica da doença (Leandro *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2006b; Costa-Val *et al.*, 2007). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa relatam que cães assintomáticos apresentam menores níveis de anticorpos circulantes, e predomínio de IgG1 associado a uma menor quantidade de parasitos em diversos tecidos (Reis *et al.*, 2006a,b). Já cães sintomáticos apresentaram

elevada produção de imunoglobulinas de diversas classes e subclasses (IgG2, IgA, IgM e IgE) (Reis *et al.*, 2006a,b). Além disto, os altos níveis de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática podem estar associados a uma resposta imune do tipo 2 (Reis *et al.*, 2006b).

Os diferentes estudos citados acima fornecem importante subsídio para a melhor compreensão dos eventos imunoprotetores na LVC. Tais estudos compõem os pilares que sustentam as atuais abordagens de teste para análise da imunogenicidade em ensaios clínicos vacinais anti-LVC (Reis *et al.*, 2010). Neste contexto, uma das primeiras abordagens propôs a análise dos níveis de óxido nítrico sérico e em sobrenadante de cultura, estudo do perfil de linfócitos T (CD5<sup>+</sup>) e suas subpopulações (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>) circulantes, bem como de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> *Leishmania*-específicos (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a). Estudos subsequentes como os de Araújo *et al.* (2009), propuseram outras abordagens como uma análise comparativa com as vacinas Leishmune<sup>®</sup> e Leishvaccine, avaliando os níveis de citocinas intracitoplasmáticas em diferentes populações de linfócitos. Neste estudo, foi observado que a imunização com Leishvaccine induz um perfil misto de resposta com um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-4. Por outro lado, a imunização com Leishmune<sup>®</sup> induziria um aumento somente na síntese de IFN- $\gamma$  e, conseqüente aumento na razão linfócito T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/ IL-4<sup>+</sup> (Araújo *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011). A avaliação das principais características fenotípicas de leucócitos caninos após vacinação com Leishvaccine e Leishmune<sup>®</sup> mostrou que Leishvaccine induziu alterações associadas à ativação de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD32<sup>+</sup>). Já a vacinação com Leishmune<sup>®</sup> levou à uma resposta seletiva, associada apenas à ativação de células T CD8<sup>+</sup> (Araújo *et al.*, 2011). Lima *et al.* (2010) realizaram uma avaliação da resposta imune em cães de Araçatuba, área endêmica para LVC, antes e após vacinação com Leishmune<sup>®</sup>. Neste estudo foi observado que a vacinação induziu aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  e redução de células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, o que poderia favorecer o estabelecimento de mecanismos associados a um padrão de proteção.

Em outro trabalho, Fernandes *et al.* (2008) avaliaram a imunogenicidade de uma vacina composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina (Leish-Tec<sup>®</sup>). Neste trabalho, ficou documentado que cães vacinados eram capazes de produzir altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2, com aumento na produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de CMSP. Em outro estudo, Holzmüller *et al.* (2005) mostraram que cães imunizados com antígeno purificado de promastigotas de *L. infantum* apresentaram uma



eficiente resposta imune celular *in vitro* contra à infecção, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  resultando na produção de óxido nítrico e morte do parasito.

Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade de se empregar um conjunto de biomarcadores para a triagem mais acurada de candidatos vacinas anti-LVC. Neste contexto, estes estudos apontam para a importância das análises de: (i) perfil imunofenotípico de linfócitos caninos *ex vivo* e *in vitro* (linfócitos T CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfócitos B CD21<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>), (ii) análise dos níveis de óxido nítrico sérico e em sobrenadante de cultura, (iii) estudo do perfil de citocinas intracitoplasmática de linfócitos e monócitos (IL-4 e IFN- $\gamma$ ) ou em sobrenadante de CMSP e/ou de células de órgãos linfóides como o baço e linfonodo (TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ). Neste sentido e tendo como base os resultados promissores das vacinas LBSap e LBSapSal observados antes e após o desafio experimental com *L. chagasi*, este trabalho propõe a ampliação dos estudos da avaliação de biomarcadores de imunogenicidade desses imunobiológicos.

### **3. Justificativa**

A leishmaniose visceral é endêmica em muitas regiões do Brasil, constituindo um sério problema de saúde pública. O controle dessa doença é baseado em ações que nem sempre apresentam resultados satisfatórios, já que o controle do vetor não tem obtido sucesso e o número de casos caninos e humanos aumentam consideravelmente a cada ano. Além disso, a eutanásia de cães infectados, que é uma medida necessária devido à impossibilidade de cura parasitológica, apresenta limitações considerando a proximidade homem-cão em nossa sociedade. Maior gravidade encontra-se na possibilidade de cães, ainda assintomáticos, atuarem como reservatório do parasito, arriscando a saúde das pessoas ao seu redor. Sendo assim, a imunoprofilaxia aparece como uma importante alternativa para interromper o ciclo biológico do parasito, impedindo que outros cães e, conseqüentemente, o homem sejam infectados. No entanto, até o momento, ainda não existem vacinas que sejam consideradas eficazes pelo Ministério da Saúde de modo que possam ser empregadas no programa oficial de controle da LVC. Tais fatos nos mostram a importância de estudos que busquem o desenvolvimento de novos antígenos e protocolos vacinais, que poderão ser utilizados em futuras campanhas de controle. Dessa forma, torna-se altamente relevante o estudo de biomarcadores de imunogenicidade vacinal em cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, antes e após o desafio com *L. chagasi*, visando compreender o potencial imunoprotetor dessas vacinas. Assim, os resultados obtidos com a realização deste trabalho poderão nortear ensaios clínicos vacinais de campo com os imunobiológicos LBSap e LBSapSal.

#### **4. Objetivos**

#### 4.1- Objetivo geral

Avaliar o perfil de citocinas, óxido nítrico e o parasitismo tecidual como potenciais biomarcadores de imunogenicidade antes e após o desafio intradérmico com *L. chagasi* em cães vacinados com LBSap e LBSapSal.

#### 4.2- Objetivos específicos

Avaliar antes do protocolo vacinal (T<sub>0</sub>), após a terceira dose dos imunobiológicos (T<sub>3</sub>) LBSap e LBSapSal e 90 (T<sub>90</sub>) e 885 dias (T<sub>885</sub>) após o desafio intradérmico com *L. chagasi*, os seguintes parâmetros:

- (i) Produção das citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ) em sobrenadante de culturas de CMSP (ELISA);
- (ii) Correlacionar a resposta imune celular (imunofenotipagem *in vitro* por citometria de fluxo) com os resultados obtidos através da avaliação do perfil de citocinas;
- (iii) Níveis de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de CMSP;
- (iv) Correlacionar a resposta imune celular (imunofenotipagem *in vitro* por citometria de fluxo) com os resultados relativos à dosagem de NO;
- (v) Parasitismo da medula óssea por “*Leishman Donovan Units*” (LDU).

## **5. Material e Métodos**

### 5.1- Animais

O material biológico deste estudo é proveniente de cães avaliados no trabalho desenvolvido por Giunchetti (2007), Roatt (2010) e Aguiar-Soares (2010). Para tanto, foram utilizados 35 cães sem raça definida (*Canis familiaris*) de ambos os sexos, provenientes de 8 cadelas matrizes do canil do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com idade média de 210 dias. Os cães foram submetidos a um rigoroso manejo sanitário, sendo que os mesmos foram vermifugados (Chemital plus<sup>®</sup>, Chemitec Agro-Veterinária LTDA., Brasil) a partir de 21 dias de idade, e vacinados contra cinomose, adenovírus tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovírus, leptospira (Vanguard<sup>®</sup> HTLP 5/CV-L, Pfizer) e raiva (Vacina anti-rábica fuenzalida modificada<sup>®</sup>, Tecpar). É importante ressaltar que esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEP 033/2008 – Projeto n° 2008/01).

Os animais foram mantidos no canil do Centro de Ciência Animal/UFOP, que é totalmente telado com malha suficientemente fina capaz de impedir a entrada de flebotomíneos, apesar de a região ser considerada área indene para leishmaniose visceral. Todas as instalações do canil foram submetidas a borrifação com inseticida piretróide a cada três meses, como medida auxiliar de combate a insetos.

### 5.2 – Produção do antígeno vacinal, do adjuvante saponina e obtenção de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*

Os imunobiológicos desenvolvidos originalmente para o trabalho desenvolvido por Giunchetti (2007), o qual foi dada continuidade nos trabalhos desenvolvidos por Roatt (2010), Aguiar-Soares (2010) e no presente trabalho, foram elaborados a partir de cultura da cepa padrão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) cultivada em meio de cultura ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), associado ao Liver Infusion Tryptose (LIT). As culturas foram armazenadas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM<sup>®</sup> modelo 347), à temperatura de 23°C ±1°C, sendo homogeneizadas diariamente. A concentração do antígeno utilizada em cada dose foi de 600mg/mL em solução salina estéril. A produção dos imunobiológicos foi descrita de forma detalhada por Giunchetti (2007).

A saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) utilizada neste estudo como adjuvante foi diluída em solução salina estéril 0,85% no momento do inóculo (1 mg/dose), para evitar perda na estabilidade.

O extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) utilizado neste estudo como componente antigênico vacinal foi cedido pelo Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos/ICB/UFMG. As glândulas salivares de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, não alimentadas, com idade de quatro dias, foram dissecadas em solução salina levemente hipotônica não tamponada a 0,8%. Após a coleta, as glândulas foram rompidas em sonicador por 10 segundos e centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C até o uso.

### 5.3- Delineamento experimental

Os cães destinados aos experimentos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais:

(i) **Grupo controle (C):** cinco cães - receberam três doses de 1mL de solução salina estéril a 0,85% por via subcutânea, em intervalos de 30 dias;

(ii) **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (LB):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas de 600µg do antígeno/dose, diluído em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;

(iii) **Grupo imunizado com adjuvante saponina (Sap):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas de 1mg de saponina/dose, diluída em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;

(iv) **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (LB) associado ao adjuvante saponina (LBSap: Vacina I):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas da formulação vacinal composta de 600µg do antígeno/dose e 1mg de saponina/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;

(v) **Grupo imunizado com saliva de *L. longipalpis* (Sal):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas de cinco ácidos de extrato de



glândula salivar/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;

**(vi) Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas de 600µg do antígeno/dose associado a cinco ácidos de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;

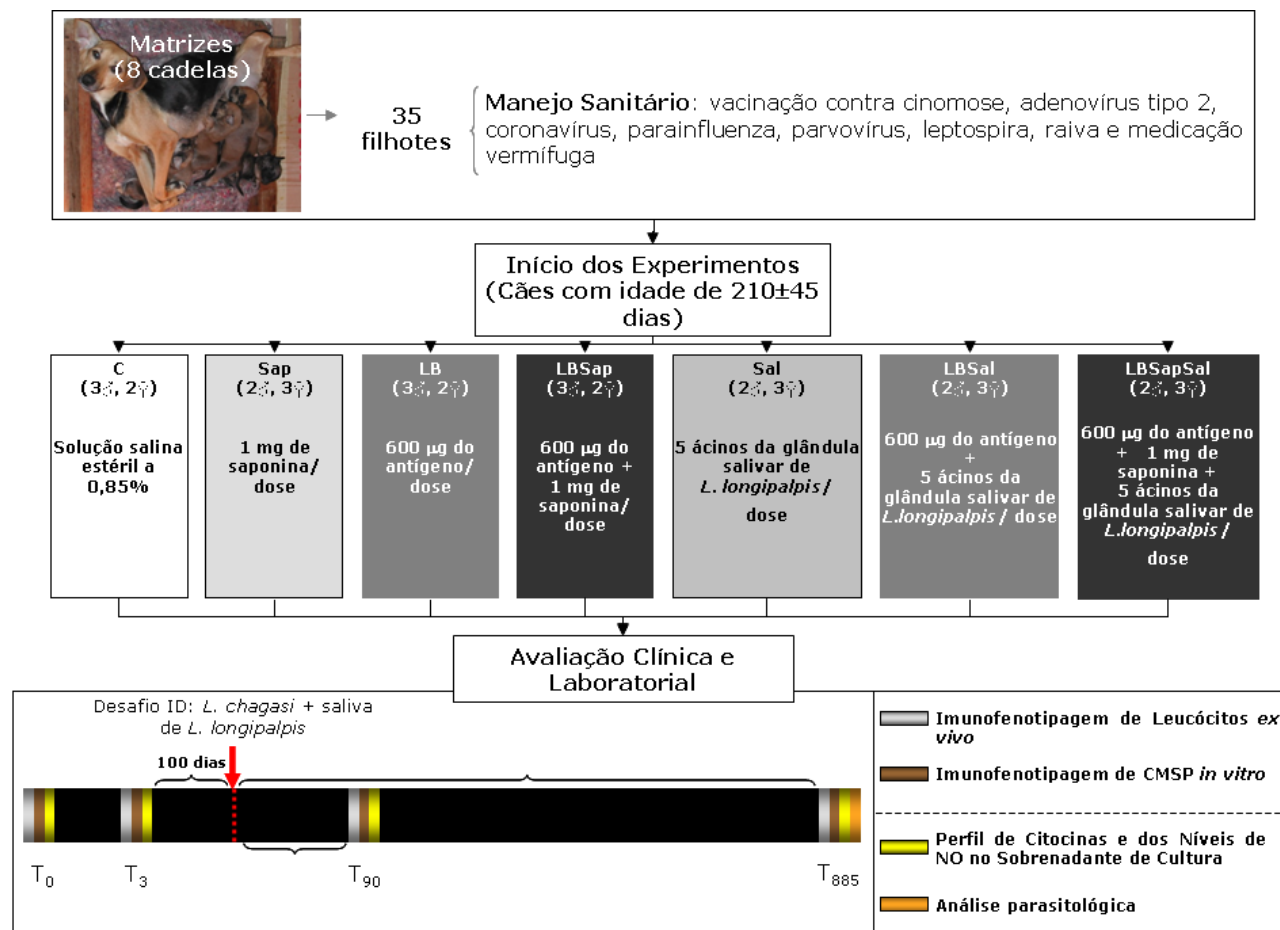
**(vii) Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina e à saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal: Vacina II):** cinco cães - receberam três doses subcutâneas da formulação vacinal II composta de 600µg do antígeno/dose, 1mg de saponina/dose e cinco ácidos de extrato de glândula salivar de *L. longipalpis*/dose, diluídos em 1mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias.

Todo o protocolo de vacinação foi realizado no mesmo dia, para todos os grupos avaliados. Os intervalos entre as doses foram divididos em cinco tempos distintos de avaliação: T<sub>0</sub> (avaliação antes da primeira dose), T<sub>3</sub> (avaliação após 15 dias da terceira dose), T<sub>90</sub> (90 dias após o desafio com *L. chagasi*) e T<sub>885</sub> (885 dias após o desafio com *L. chagasi*), conforme ilustrado pelo Diagrama 1.

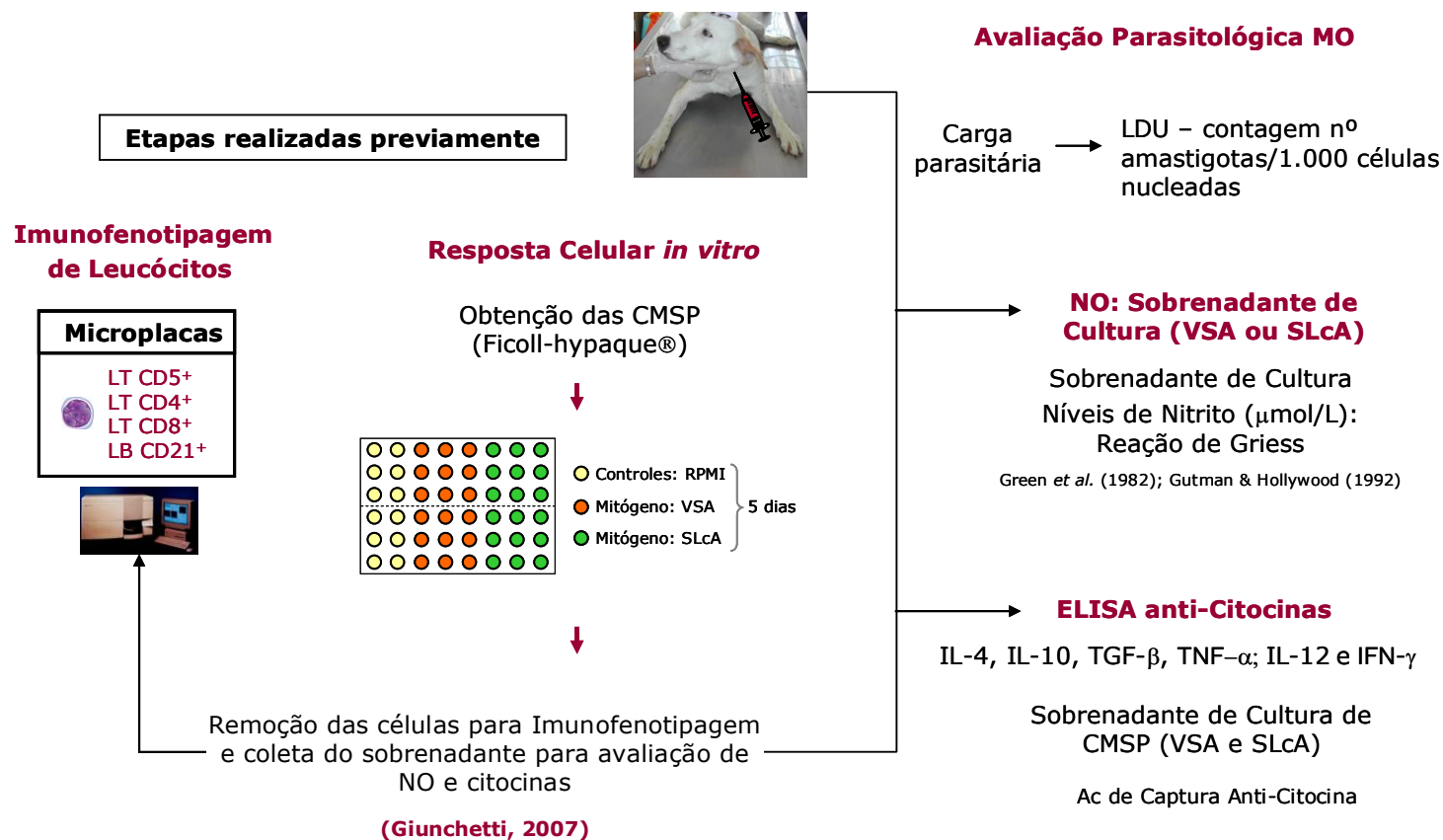
O desafio experimental dos animais foi realizado após 100 dias do término do protocolo vacinal, onde todos os cães receberam  $1,0 \times 10^7$  promastigotas de *L. chagasi* em fase estacionária de cultivo, pela via intradérmica na face interna da orelha esquerda, sendo inoculado junto com os parasitos, 5 ácidos da glândula salivar de *L. longipalpis*, conforme descrito por Roatt (2010) e Aguiar-Soares (2010).

Importantes metodologias utilizadas nesse trabalho só foram possíveis de serem realizadas devido à realização prévia de experimentos de imunofenotipagem *in vitro* em CMSP (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) cultivadas sob estímulo do antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). A realização desses experimentos permitiu a coleta de sobrenadantes das culturas para dosagem de óxido nítrico e citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4) que foram armazenados em *freezer* -80°C, nos tempos T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>90</sub> e T<sub>885</sub>. Além disso, os resultados de imunofenotipagem obtidos previamente foram utilizados para análises de correlação com os resultados de citocinas e óxido nítrico, como ilustrado no Diagrama 2.

No tempo T<sub>885</sub>, foram coletadas amostras de medula óssea, por ocasião da necrópsia dos cães, para avaliação da carga parasitária por “*Leishman Donovan Units*” (LDU). É importante salientar que a eutanásia de todos os cães foi realizada no tempo T<sub>885</sub>, sob supervisão de um médico veterinário, empregando-se anestésico barbitúrico (35mg/Kg de Tiopental Sódico) seguido de solução saturada de cloreto de potássio, aplicados por via endovenosa.



**Diagrama 1:** Esquema do delineamento experimental utilizado na avaliação de cães controle (C) e de cães submetidos a imunizações com antígenos de *L. braziliensis* (LB), saponina (Sap), antígeno de *L. braziliensis* + saponina (LBSap; vacina I), saliva de *L. longipalpis* (Sal), antígeno de *L. braziliensis* + saliva de *L. longipalpis* (LBSal) e antígeno de *L. braziliensis* + saponina + saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal, Vacina II). T<sub>0</sub> = Antes da 1ª imunização, T<sub>3</sub> = 15 dias após a terceira imunização; T<sub>90</sub> = 90 dias após o desafio com *L. chagasi*; T<sub>885</sub> = 885 dias após o desafio com *L. chagasi*. CMSP: células mononucleares do sangue periférico; ID: intra-dérmico; NO: óxido nítrico.



**Diagrama 2:** Esquema das etapas experimentais realizadas previamente (lado esquerdo) e etapas realizadas por ocasião do presente trabalho (lado direito). CMSP: células mononucleares do sangue periférico; VSA: antígeno solúvel vacinal; SLcA: antígeno solúvel de *L. chagasi*; NO: óxido nítrico; LDU: *Leishman donovan units*; Ac: anticorpo.

## 5.4- Etapas realizadas previamente:

### 5.4.1- Obtenção de amostras de sangue periférico

Amostras de sangue periférico foram coletadas, através de punção da veia jugular ou radial, em seringas descartáveis estéreis de 20 mL. Em seguida, foram transferidos 5mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados à imunofenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo. Para realização dos testes *in vitro*, 30 mL de sangue foram coletados em duas seringas descartáveis estéreis heparinizadas de 20 mL. O sangue permaneceu em temperatura ambiente, por até 3 horas, até o momento do uso.

### 5.4.2- Cultura de células mononucleares do sangue periférico

Para obtenção dos leucócitos do sangue periférico no contexto *in vitro*, o sangue coletado em seringas heparinizadas foi lentamente adicionado sobre 10mL de Ficoll-hypaque (Histopaque® 1.077 - SIGMA Co., EUA) gelado em tubos de polipropileno, e submetido a centrifugação à 1200rpm por 40 minutos em temperatura ambiente. Foi removido o anel celular contendo células mononucleares, e lavadas por duas vezes em centrifugação a 1500rpm por 10 minutos a 4°C com RPMI 1640. Ao final, as células foram ressuspensas em 1mL em RPMI 1640 e o volume final de PBMC ajustado para conter  $10^7$  células/mL e submetidas a cultura conforme descrito por Giunchetti (2007).

Para as culturas de células mononucleares destinadas a coleta de sobrenadante para dosagem de óxido nítrico e citocinas e obtenção de células estimuladas para imunofenotipagem nos tempos  $T_0$ ,  $T_3$ ,  $T_{90}$  e  $T_{885}$ , foram utilizadas placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, USA), nas quais foram adicionados 650 $\mu$ L de meio de cultura (10% Soro fetal bovino/1% de Estreptavidina/Penicilina, 2 mM L-glutamina e 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol, em RPMI 1640), 50 $\mu$ l de CMSP ( $5.0 \times 10^5$  células/orifício) com 100 $\mu$ L antígeno solúvel vacinal (*L. braziliensis*, 200 $\mu$ g/mL) ou 100 $\mu$ L soluble *L. chagasi* (200 $\mu$ g/mL), que foram comparadas as culturas controle (não estimuladas) sendo adicionado no lugar do estímulo antigênico 100 $\mu$ L de RPMI. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por cinco dias.

Após o período de incubação, foi realizada a remoção das células para fenotipagem, conforme protocolo descrito por Giunchetti *et al.* (2007). Brevemente, as placas de cultura foram centrifugadas a 1500rpm, por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante de cultura foi removido e armazenado em *freezer* -80°C, para dosagem de citocinas e óxido nítrico. Subsequentemente, os orifícios da placa foram lavados com 1mL de RPMI 1640 para retirada das células de cada estímulo avaliado (culturas: controle, estimulada com antígeno vacinal ou com antígeno de *L. chagasi*). As células de cada estímulo foram transferidas para tubos de poliestireno (Falcon<sup>®</sup> 2054, Becton Dickinson, San Jose, E.U.A.) e submetidos a centrifugação a 1500rpm em temperatura ambiente. Após os tubos serem vertidos para remoção do sobrenadante, as células foram fixadas com 3mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, E.U.A.), por 10 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a 1500rpm, e as células ressuspensas em 300µL de solução fixadora para citometria - MaxFacsFix (10 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Desta forma, as células obtidas foram submetidas à reação de imunofenotipagem de leucócitos em microplacas.

#### 5.4.3- Imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos circulantes e de células mononucleadas do sangue periférico estimuladas *in vitro*

Para os ensaios de imunofenotipagem utilizando microplacas, apenas o anticorpo monoclonal anti-CD21 utilizado na fenotipagem celular foi adquirido já marcado com fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína: emitem fluorescência tipo 1 – FL1). Os demais anticorpos (anti-CD5, anti-CD4 e anti-CD8) são puros, não sendo marcados com fluorocromos. Nestes casos, foi empregado anticorpo secundário anti-rato marcados com FITC para revelação da marcação. Para aquisição e armazenamento dos dados referentes à resposta celular foi empregado um citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Diego, E.U.A.), equipado com um sistema de computador contendo o *software* - *Cell Quest*, fornecido pelo fabricante do equipamento.

A partir dos leucócitos obtidos no contexto *in vitro*, foi realizada a reação de imunofenotipagem em microplacas, de acordo com Reis *et al.* (2005). Brevemente, os anticorpos primários foram diluídos em solução em solução de PBS pH 7,2/20% SFB

(FACS dil) e distribuídos em microplacas de 96 orifícios, fundo em "U" (LIMBRO, INC Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio). Em cada orifício foram colocados 30µL dos anticorpos anti-CD5 (1:200), anti-CD4 (1:1000), anti-CD8 (1:200), e anti-CD21 (1:100). Cada fileira horizontal de uma placa (12 orifícios) compreendeu na marcação fenotípica de um dos estímulos utilizados no contexto *in vitro* para os anticorpos citados anteriormente. O ensaio de imunofenotipagem de leucócitos em microplacas foi realizado adicionando-se em cada orifício 30µL da suspensão celular e deixada sob incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 140µL de PBS 1X, e as placas submetidas a centrifugação à 2500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensão e adicionado 60µL do anticorpo secundário anti-rato (1:400) e deixado em incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas por 2 vezes, com 140µL de PBS pH 7,2, submetidas a centrifugação à 2500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas e adicionados 170µL da solução fixadora (MaxFacsFix). Com o auxílio de uma pipeta multicanal, as células foram transferidas para uma estante de tubos pequenos e procedida a leitura do material no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Jose, CA, E.U.A.). Os resultados obtidos pela imunofenotipagem *in vitro* de leucócitos caninos foram analisados e destinados as análises estatísticas de correlação com o perfil de citocinas.

## 5.5- Etapas realizadas por ocasião do presente estudo:

### 5.5.1- Avaliação parasitológica

A carga parasitária foi avaliada empregando-se o método “Leishman Donovan Units” (LDU). Dessa forma, a detecção do parasito foi realizada através da obtenção de esfregaços de medula óssea em lâminas coradas pelo *Giemsa*. Esta estratégia permitiu a avaliação da carga parasitária empregando-se a técnica de LDU (*Leishman Donovan Units*). Neste sentido, foi contado em cada lâmina o número de amastigotas em 1.000 células nucleadas do esfregaço (Reis *et al.*, 2006a). Esta metodologia permite, após a contagem, a obtenção de um índice de carga parasitária a partir dos esfregaços de medulas ósseas dos animais dos diferentes grupos experimentais.

### 5.5.2- Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) anti-citocinas

#### 5.5.2.1- Quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-4, e IL-10

A determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4, e IL-10 foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se o sobrenadante de culturas de células mononucleares caninas estimuladas com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). Foram utilizados anticorpos e proteínas recombinantes R&D Systms, Inc., Minneapolis, USA. A cada poço de uma placa de 96 poços (COSTAR<sup>®</sup>, USA) foram adicionados 25 $\mu$ L de anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada, diluído em PBS estéril. As placas foram cobertas e incubadas durante o período noturno à temperatura ambiente. Anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e 4 sucessivas lavagens com 100 $\mu$ L da solução de PBS-Tween 20. A seguir, as placas foram bloqueadas com 75 $\mu$ L/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1% e 0,05% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>), durante uma hora, a temperatura ambiente, e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras do sobrenadante de culturas foram aplicadas em um volume de 25 $\mu$ L em cada poço da placa. Paralelamente, a citocina investigada foi diluída em várias concentrações para estabelecimento de uma curva padrão, sendo que a diluição foi feita em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). As placas foram vagarosamente homogeneizadas por um minuto e, em seguida, foram cobertas e incubadas por uma hora e meia, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com 100 $\mu$ L de PBS-Tween 20. Em seguida, foi adicionado 25 $\mu$ L do anticorpo biotilado diluído apropriadamente em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN<sub>3</sub>), em cada poço da placa. As placas foram mais uma vez mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente, por uma hora e meia, e, em seguida foram lavadas em PBS-Tween 20. Então, após remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada poço 25 $\mu$ L de estreptoavidina (R&D Systms, Inc., Minneapolis, USA., DY998) diluída em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN<sub>3</sub>). As placas foram mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente, por vinte minutos. Após a incubação, foram novamente lavadas e, em cada poço, foi adicionado 25 $\mu$ L da solução de substrato (mistura 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina). Mais uma vez as placas foram incubadas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por trinta minutos. Em seguida, foi adicionado 25 $\mu$ L por poço da



solução de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M). A densidade óptica foi, então, determinada usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) no comprimento de onda de 450 nm.

#### 5.5.2.2- *Quantificação de IL-12 e IFN- $\gamma$*

Para determinar os níveis de IL-12 e IFN- $\gamma$ , foram utilizados os kits DuoSets (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA., DY1969, DY781) para realização do ensaio ELISA de captura em amostras de sobrenadante de culturas de células mononucleares caninas estimuladas com antígeno vacinal e antígeno de *L. chagasi*. O ensaio foi desenvolvido de acordo com instruções do fabricante dos anticorpos R&D Systems. Foram utilizadas placas de 96 poços (COSTAR, USA), onde foi feita a sensibilização, por toda a noite, com 25 $\mu\text{L}$  do anticorpo de captura (Part 842609) diluído em PBS estéril, na concentração de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As placas foram lavadas 4 vezes com 100 $\mu\text{L}$  solução de lavagem PBS-Tween 20 e incubadas, em temperatura ambiente, com solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) por 1 hora. Foi realizada uma nova etapa de lavagem com 100 $\mu\text{L}$  de PBS-Tween 20 e, em seguida foi adicionado 25 $\mu\text{L}$  da amostra, sem diluição, em cada poço. Paralelamente, para estabelecimento da curva padrão, foi adicionado 25 $\mu\text{L}$  da proteína recombinante (Part 842611) diluída em PBS com 1% de BSA, em diluição seriada, começando com a concentração inicial de 4000 pg/mL. Após 2 horas de incubação, em temperatura ambiente, foi repetido o processo de lavagem com 100 $\mu\text{L}$  de solução PBS-Tween 20 e aplicado 25  $\mu\text{L}$  de Streptoavidina-HRP (Part 890803). Após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, foi repetido o processo de lavagem com 100 $\mu\text{L}$  da solução PBS-Tween 20. Então foi adicionado 25 $\mu\text{L}$  da solução substrato, que corresponde a uma mistura 1:1 do reagente de cor A,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e reagente de cor B, tetrametilbenzidina, (R&D Systems, DY999). Após 20 minutos de incubação, em temperatura ambiente, foi adicionado 13 $\mu\text{L}$  da solução de parada (R&D Systems, DY994). A determinação da densidade óptica foi feita imediatamente, usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) no comprimento de onda de 450 nm.

#### 5.5.2.3- *Quantificação de TGF- $\beta$*

O nível de TGF- $\beta$  foi quantificado por ELISA, através do kit comercial Quantikine® (R&D Systems, MB100B, SMB100B, PMB100B). Todo o procedimento foi realizado de

acordo com instruções do fabricante. Dessa forma, foi feita a ativação das amostras de sobrenadante de culturas de células mononucleares caninas estimuladas com antígeno solúvel de *L. chagasi* e das amostras controle. Em seguida, o procedimento foi efetuado em placas já sensibilizadas do kit. As soluções utilizadas foram as mesmas descritas anteriormente.

### 5.5.3- Avaliação da produção de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico

A quantificação dos níveis de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro* foi realizada, indiretamente, pela medida de nitrito no sobrenadante das culturas de CMSP, através da reação de Griess (Green et al., 1982, Gutman & Hollywood, 1992). Os sobrenadantes foram coletados conforme descrito no item 5.4 de Material e Métodos. As amostras foram descongeladas do freezer -80°C e alíquotas de 100µL por poço foram depositadas, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo plano (Nunc, Naperville, EUA). Em seguida, foram adicionados 100µL do reagente de Griess (0.1% N-(1-Nafitiletienodiamina, 1% sulfanilamida, 5% ácido fosfórico) (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) em cada poço, e foi feita incubação, a temperatura ambiente, por 10 minutos, ao abrigo da luz. A seguir, foi determinada a absorbância em leitor automático de microplacas (Multiskan® MCC 340; Labsystems, Helsinki, Finland) com filtro de 570nm. Os resultados foram determinados após a extrapolação de valores obtidos de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) nas concentrações de 0,78µM a 100µM para cada placa. Estes foram expressos considerando-se o valor da concentração de nitrito em µM obtido em cada uma das culturas.

## 5.6- Análise estatística dos dados

A realização dos testes estatísticos foi feita com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os testes de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram empregados para avaliação entre os grupos vacinais relacionados aos resultados do perfil de citocinas e óxido nítrico.

As análises entre as culturas controle e as culturas estimuladas de cada grupo avaliado foram realizadas com auxílio do Teste T não pareado. Foram empregadas correlações de Pearson ( $r$ ) para as avaliações entre o perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes e o perfil de citocinas, bem como entre o perfil de citocinas e óxido nítrico. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de  $P$  foi  $<0,05$ .

## **6. Resultados**

### 6.1- Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico antes e após o desafio com *L. chagasi* em cães imunizados com LBSap e LBSapSal

Para verificar se os cães vacinados com LBSap e LBSapSal apresentaram um perfil de resposta imune associado a susceptibilidade à LVC, foi realizada a dosagem das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante de CMSP de cães imunizados nos tempos T<sub>0</sub> (antes da primeira dose vacinal), T<sub>3</sub> (após a terceira dose vacinal), T<sub>90</sub> (90 dias após o desafio com *L. chagasi*) e T<sub>885</sub> (885 dias após o desafio com *L. chagasi*). Neste sentido, os resultados serão descritos em pg/mL, para todas as citocinas avaliadas no presente estudo, pela análise comparativa entre as culturas controles (CC) e as culturas estimuladas (CE; com antígeno solúvel vacinal - VSA; ou antígeno solúvel de *L. chagasi* - SLcA) de cada grupo e entre as culturas estimuladas dos diferentes grupos avaliados.

#### 6.1.1- Análise dos níveis de IL-4

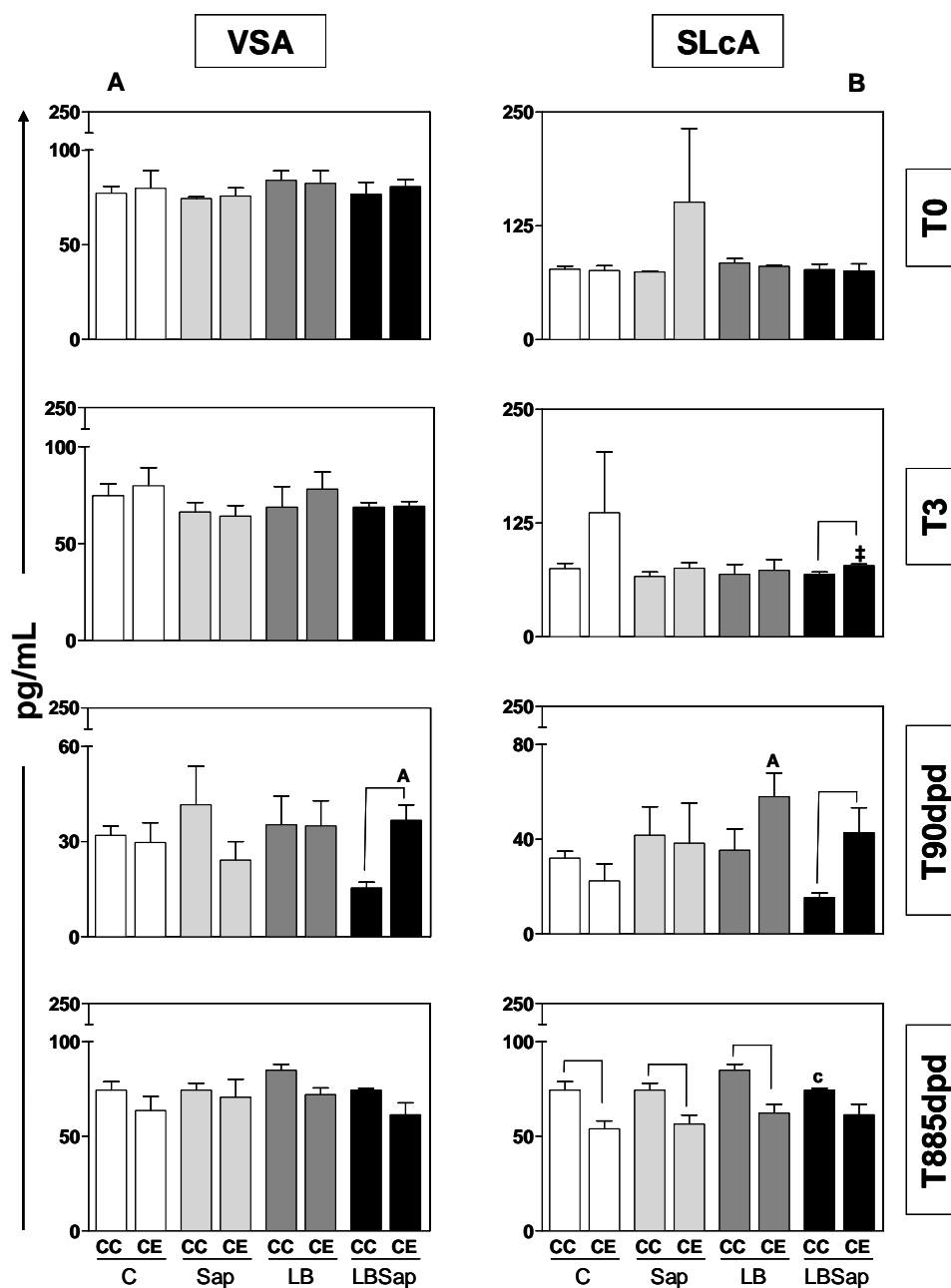
As Figuras 1 e 2 representam a análise comparativa entre os níveis de IL-4 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. Os painéis A e B (Figura 1 ou 2) ilustram os níveis de IL-4 na presença dos estímulos VSA e SLcA, respectivamente.

No tempo T<sub>3</sub>, o grupo LBSap apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-4 na cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap em relação à cultura controle e em relação à cultura estimulada com VSA (Figura 1A/B).

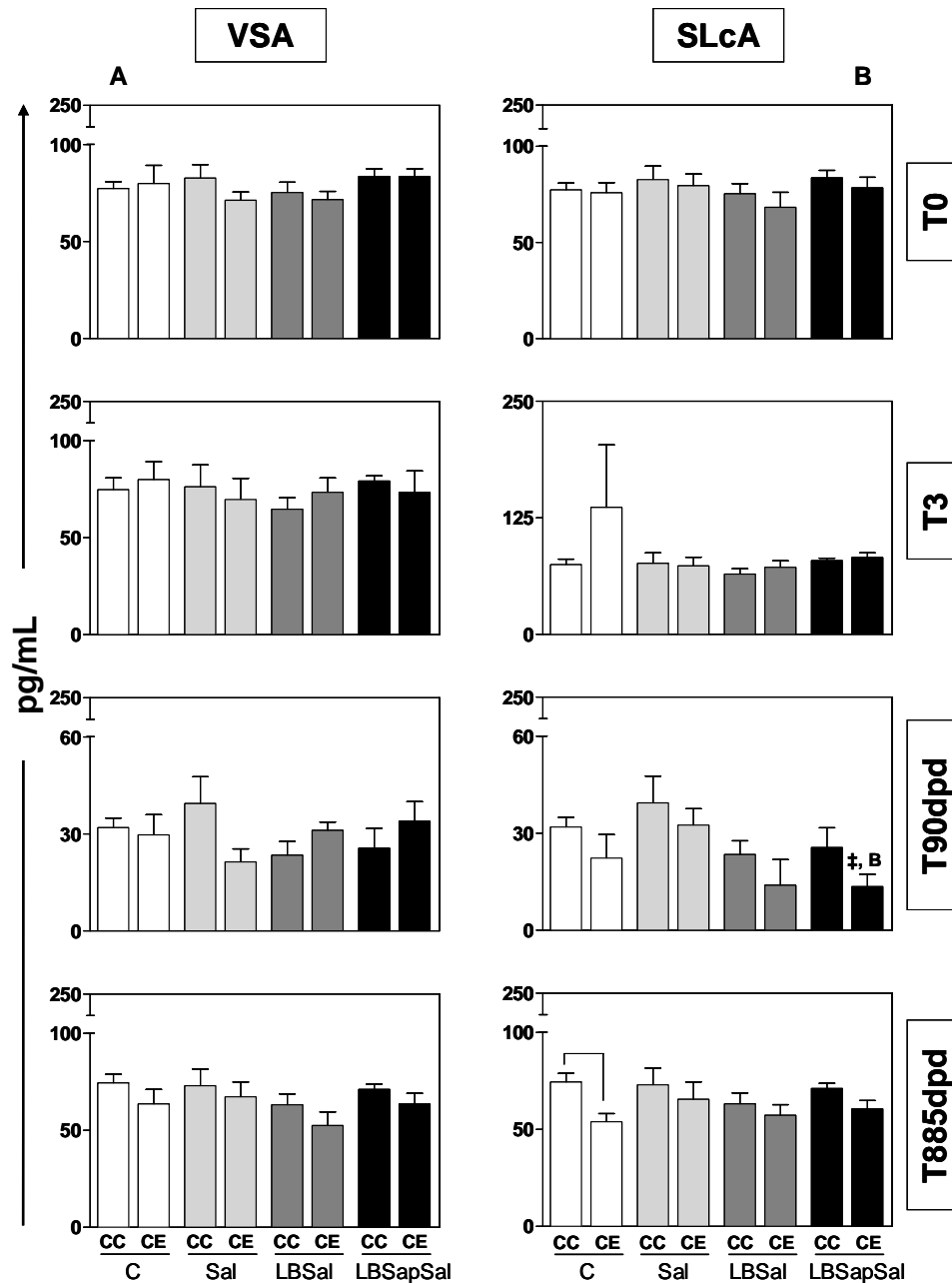
No tempo T<sub>90</sub>, foi observado aumento significativo da quantidade de IL-4 na cultura estimulada com VSA do grupo LBSap em relação à cultura controle (Figura 1A). O grupo LBSap também apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) desta citocina na cultura estimulada com VSA quando comparada à cultura com mesmo estímulo do grupo controle (Figura 1A). Houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-4 na cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap em relação à cultura controle (Figura 1B). Foi observado na cultura estimulada com SLcA do grupo LB aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de IL-4 quando comparada à cultura com mesmo estímulo do grupo C (Figura 1B). Ainda em T<sub>90</sub>, a cultura estimulada com VSA do grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) desta citocina em relação à cultura estimulada com SLcA (Figura

2A/B), bem como redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-4 em relação ao grupo Sal (Figura 2B).

No tempo T<sub>885</sub>, foi observada redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-4 nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C, Sap e LB em relação às respectivas culturas controle (Figura 1B). Além disto, a cultura controle do grupo LBSap apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-4 em relação à cultura controle do grupo LB (Figura 1B).



**Figura 1:** Perfil de IL-4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; □), inoculados com *L. braziliensis* (LB; ■) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-4. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo ≠ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



**Figura 2:** Perfil de IL-4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), inoculados com saliva de *L. longipalpis* (Sal; ◻), inoculados com *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal; ◼) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-4. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo ≠ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.



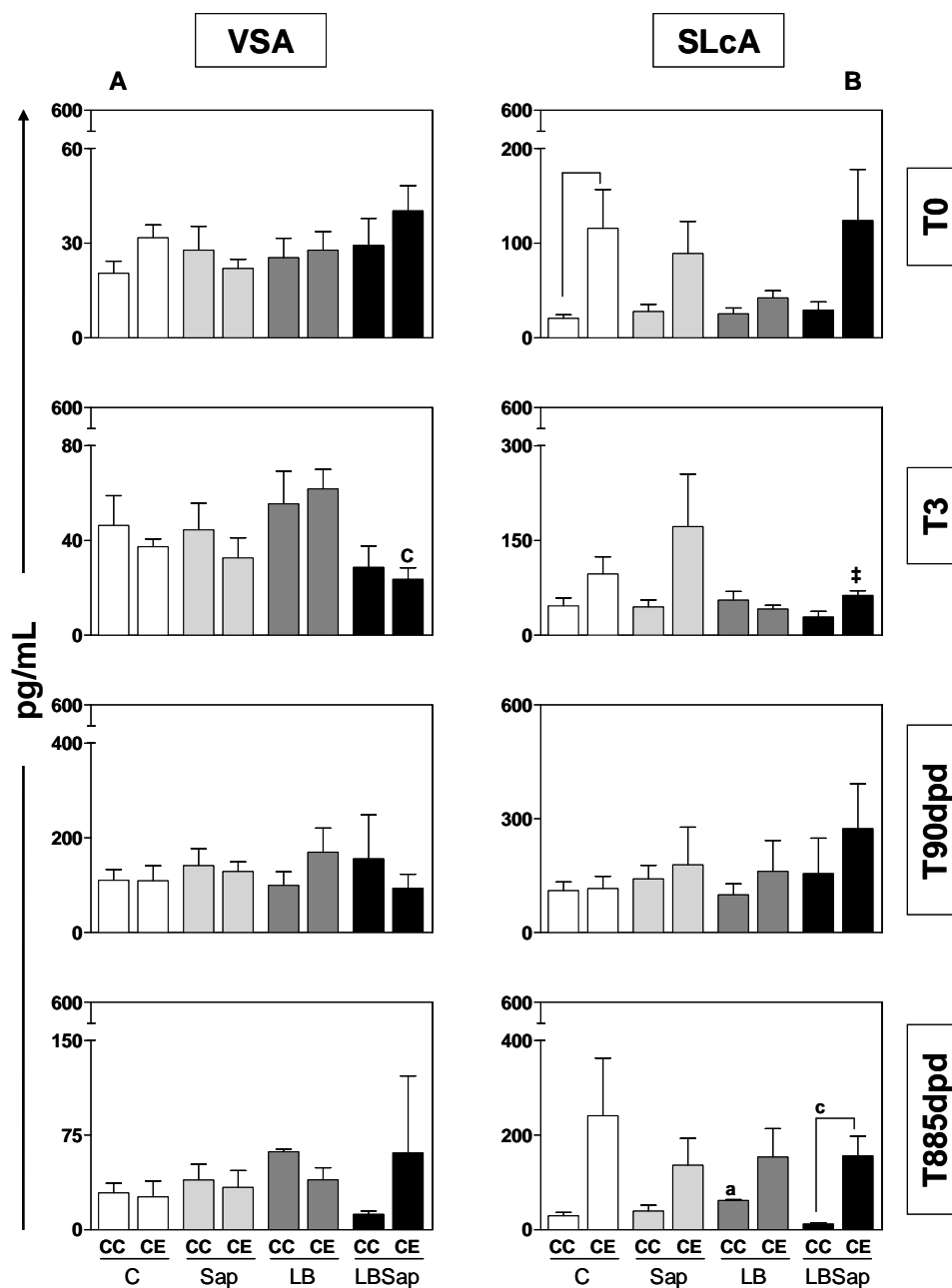
### 6.1.2- Análise dos níveis de IL-10

As Figuras 3 e 4 representam a análise comparativa entre os níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. Os painéis A e B (Figura 3 ou 4) ilustram os níveis de IL-10 na presença dos estímulos VSA e SLcA, respectivamente.

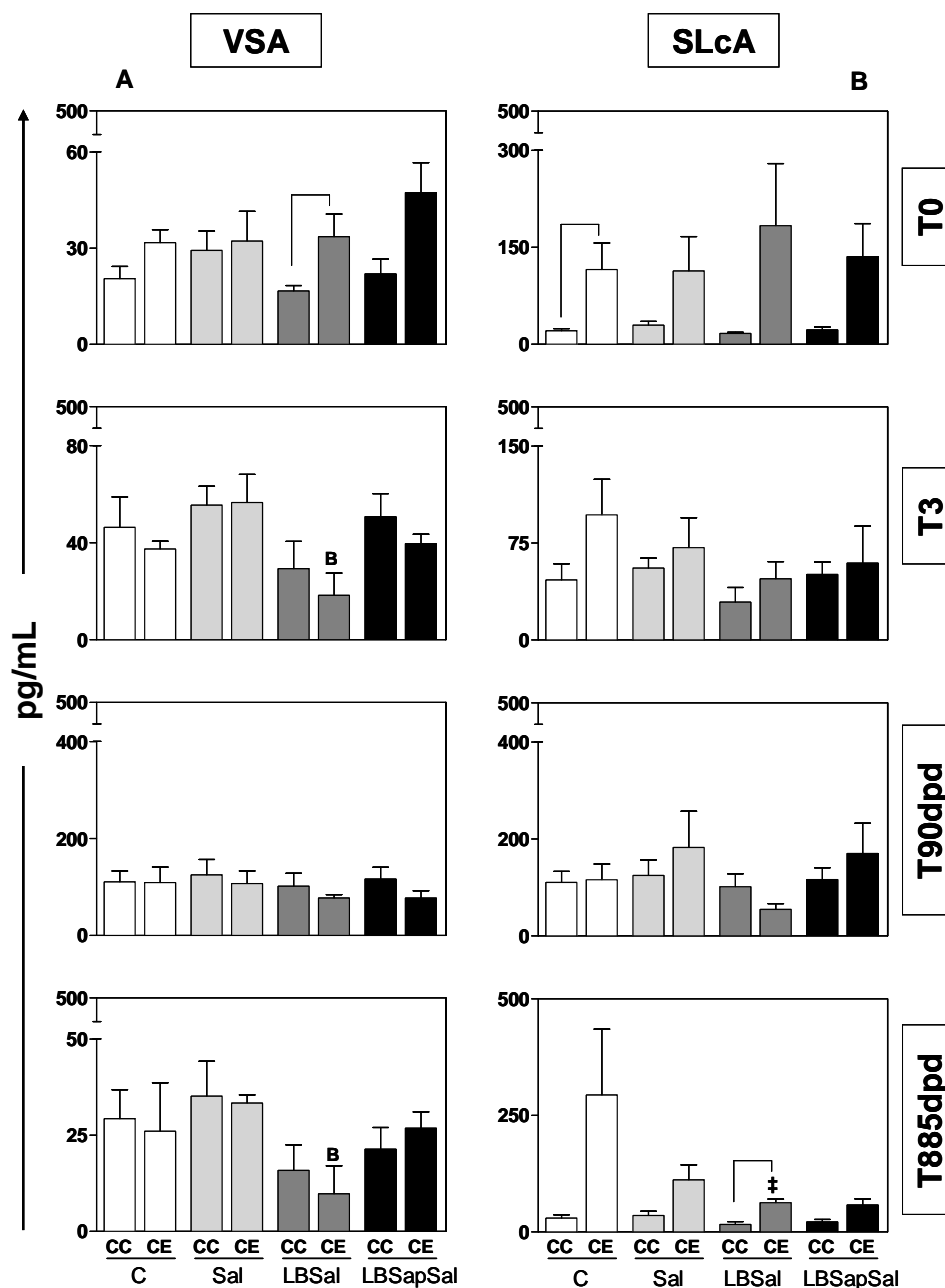
No tempo  $T_0$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-10 na cultura estimulada com SLcA do grupo C em relação à cultura controle (Figura 3B). Neste mesmo tempo, o grupo LBSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-10 na cultura estimulada com VSA em relação à respectiva cultura controle (Figura 4A).

De forma interessante, ao avaliar o tempo  $T_3$  foi observado redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-10 na cultura estimulada com VSA do grupo LBSap quando comparada à cultura com mesmo estímulo do grupo LB (Figura 3A). No grupo LBSap, a cultura estimulada com SLcA apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da quantidade de IL-10 em relação à cultura estimulada com VSA (Figura 3B). Ainda em  $T_3$ , a cultura estimulada com VSA do grupo LBSal apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-10 em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo Sal (Figura 4A).

No tempo  $T_{885}$ , foi observado aumento significativo dos níveis de IL-10 na cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap em relação à respectiva cultura controle (Figura 3B). No entanto, de forma interessante, a cultura controle do grupo LBSap apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) de IL-10 quando comparada à cultura controle do grupo LB (Figura 3B). Além disto, a cultura controle do grupo LB apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da quantidade desta citocina em relação à cultura controle do grupo C (Figura 3B). No grupo LBSal, a cultura estimulada com VSA apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-10 quando comparada à cultura com mesmo estímulo do grupo Sal (Figura 4A). No grupo LBSal, a cultura estimulada com SLcA apresentou quantidades significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) de IL-10 em relação à respectiva cultura controle, bem como em relação à cultura estimulada com VSA deste mesmo grupo (Figura 4A/B).



**Figura 3:** Perfil de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ◻), inoculados com *L. braziliensis* (LB; ◼) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-10. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo # representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



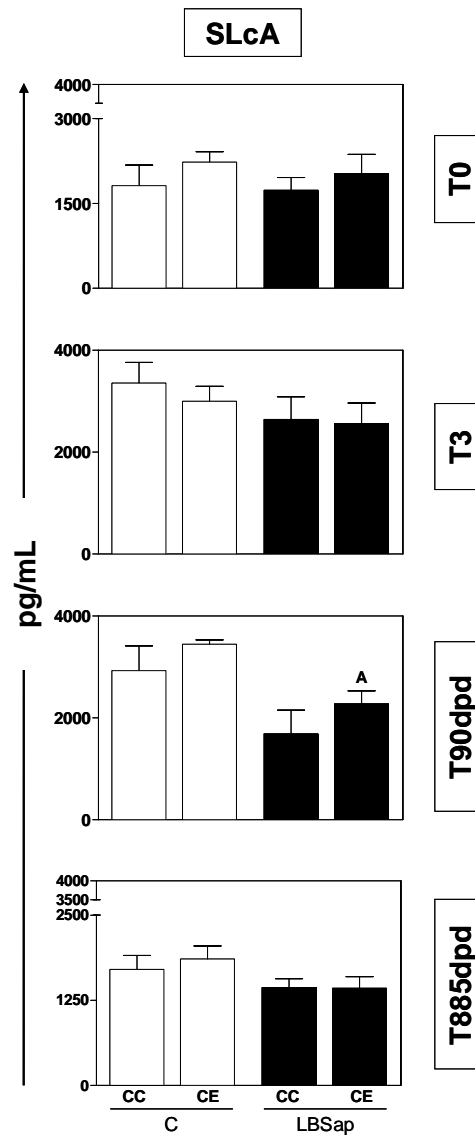
**Figura 4:** Perfil de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), inoculados com saliva de *L. longipalpis* (Sal; ◻), inoculados com *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal; ◼) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-10. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo ≠ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.

### 6.1.3- Análise dos níveis de TGF- $\beta$

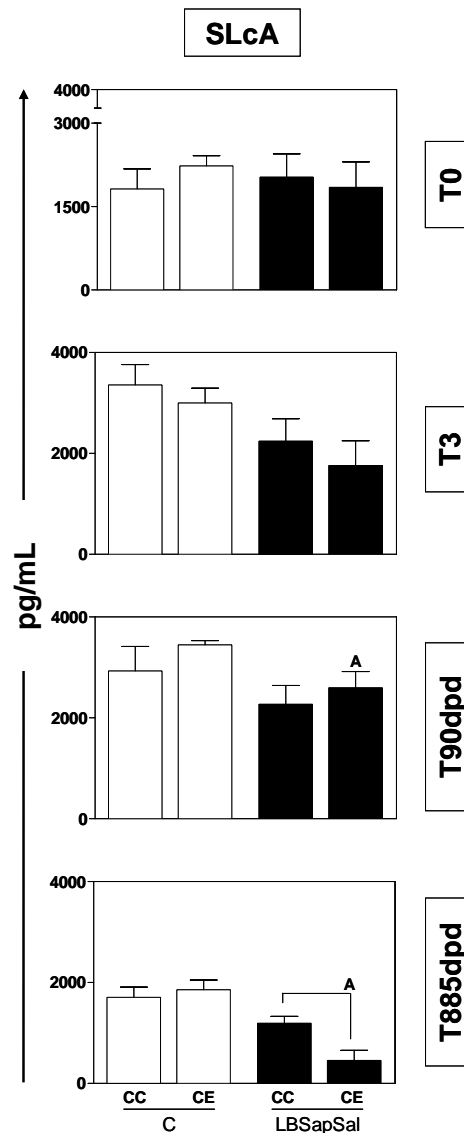
As Figuras 5 e 6 representam a análise comparativa entre os níveis de TGF- $\beta$  em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. A avaliação dos níveis desta citocina foi realizada apenas na presença ou ausência de estímulo com SLcA e entre os grupos vacinais (LBSap e LBSapSal) em relação ao grupo controle.

De forma interessante, no tempo T<sub>90</sub> foi observada redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TGF- $\beta$  da cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap (Figura 5) e LBSapSal (Figura 6) em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo C.

No tempo T<sub>885</sub>, a cultura estimulada com SLcA do grupo LBSapSal apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TGF- $\beta$  em relação à respectiva cultura controle (Figura 6). Além disto, a cultura controle estimulada com SLcA do grupo LBSapSal também apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) da quantidade de TGF- $\beta$  em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo controle (Figura 6).



**Figura 5:** Perfil de TGF- $\beta$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando o estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) dos grupos controle (C; □), e vacinados com *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de TGF- $\beta$ . A letra A representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a culturas estimulada com SLcA do grupo LBSap em relação ao grupo C. As análises foram feitas nos tempos T0 (antes da primeira dose vacinal), T3 (após a terceira dose vacinal), T90d (90 dias pós desafio com *L. chagasi*) e T885d (885 dias pós desafio com *L. chagasi*).



**Figura 6:** Perfil de TGF- $\beta$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando o estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) dos grupos controle (C; □), e vacinados com *L. braziliensis* associada à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de TGF- $\beta$ . As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A letra A representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a culturas estimulada com SLcA do grupo LBSap em relação ao grupo C. As análises foram feitas nos tempos T0 (antes da primeira dose vacinal), T3 (após a terceira dose vacinal), T90dpd (90 dias pós desafio com *L. chagasi*) e T885dpd (885 dias pós desafio com *L. chagasi*).

## 6.2- Avaliação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-12 no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico antes e após o desafio com *L. chagasi* em cães imunizados com LBSap e LBSapSal

Com a finalidade de verificar se as vacinas LBSap e LBSapSal induziram a produção de citocinas relacionadas a resistência contra a leishmaniose visceral canina, foi feita a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 no sobrenadante de CMSP de cães dos diferentes grupos experimentais nos tempos T<sub>0</sub> (antes da primeira dose vacinal), T<sub>3</sub> (após a terceira dose vacinal), T<sub>90</sub> (90 dias após o desafio com *L. chagasi*) e T<sub>885</sub> (885 dias após o desafio com *L. chagasi*). A avaliação foi feita também após estímulo antigênico com o antígeno solúvel vacinal (VSA) ou com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA), sendo os resultados expressos em pg/mL.

### 6.2.1- Análise dos níveis de TNF- $\alpha$

As Figuras 7 e 8 representam a análise comparativa entre os níveis de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. Os painéis A e B (Figura 7 ou 8) ilustram os níveis de TNF- $\alpha$  na presença dos estímulos VSA e SLcA, respectivamente.

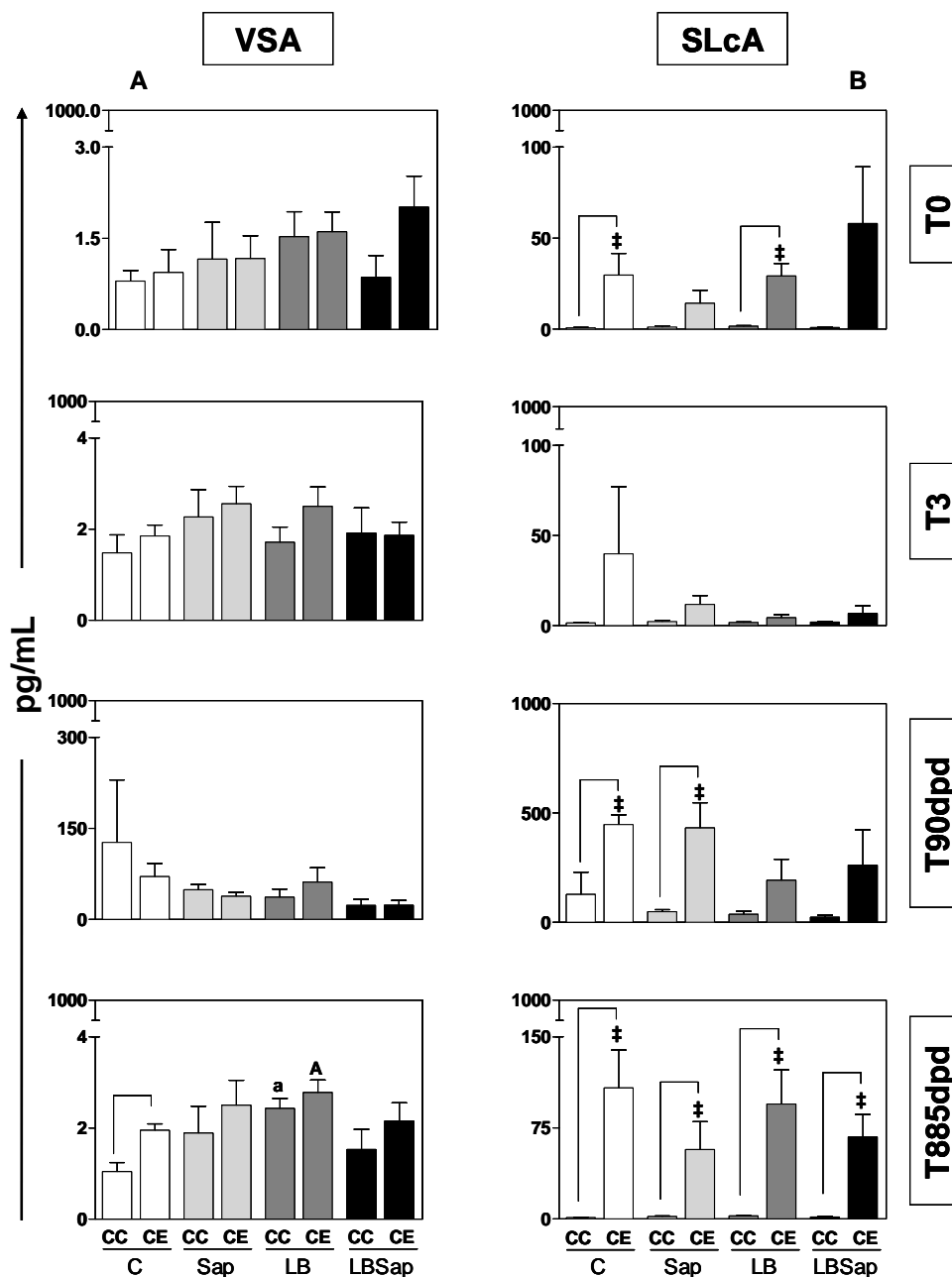
No tempo T<sub>0</sub> (antes da primeira dose vacinal), foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$ , nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C e LB (Figura 7B) e do grupo LBSapSal (Figura 8B), em relação às respectivas culturas controle. Além disso, as culturas estimuladas com SLcA destes grupos (C, LB e LBSapSal) apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA (Figura 7 e 8, A/B).

No tempo T<sub>90</sub> foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C e Sap em relação às respectivas culturas controle e em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA de cada grupo (Figura 7A/B). Neste mesmo tempo, também foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) desta citocina na cultura estimulada com SLcA do grupo Sal em relação à respectiva cultura controle. Além disto, tanto o grupo Sap (Figura 7B) como os grupos Sal e LBSal (Figura 8B) apresentaram aumento ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  e em relação às respectivas

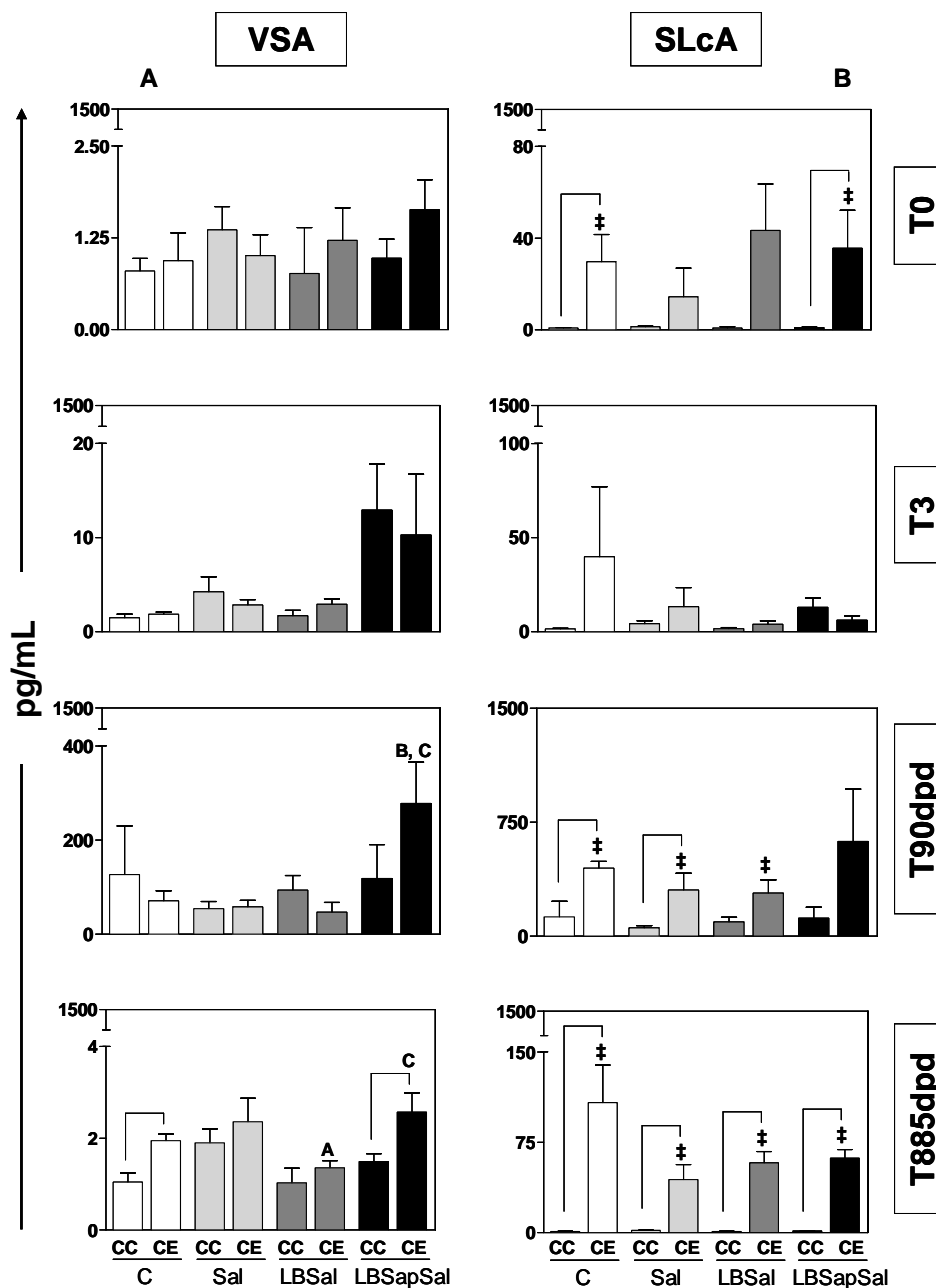
culturas estimuladas com SLcA. De forma interessante, no tempo  $T_{90}$  e na presença de VSA, apenas o grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de TNF- $\alpha$  em relação as culturas estimuladas (VSA) dos grupos Sal e LBSal (Figura 8A).

No tempo  $T_{885}$  foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de TNF- $\alpha$  na cultura estimulada com VSA em relação à respectiva cultura controle do grupo C (Figura 7A). Também foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) desta citocina na cultura controle do grupo LB em relação à cultura controle do grupo C, bem como aumento na cultura estimulada com VSA do grupo LB em relação à cultura estimulada com VSA do grupo C (Figura 7A). A cultura estimulada com VSA do grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da produção de TNF- $\alpha$  em relação à respectiva cultura controle e em relação à cultura estimulada com VSA do grupo LBSal (Figura 8A). Houve também aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis desta citocina na cultura estimulada com VSA do grupo LBSal em relação à cultura com o mesmo estímulo do grupo C (Figura 8A). Ainda no tempo  $T_{885}$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da produção de TNF- $\alpha$  em todas as culturas estimuladas com SLcA em relação às respectivas culturas controle e em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA dos grupos C, Sap, LB, LBSap (Figura 7A/B) e Sal, LBSal, LBSapSal (Figura 8A/B).





**Figura 7:** Perfil de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; □), inoculados com *L. braziliensis* (LB; ■) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de TNF- $\alpha$ . As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo  $\neq$  representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



**Figura 8:** Perfil de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), inoculados com saliva de *L. longipalpis* (Sal; □), inoculados com *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal; □) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de TNF- $\alpha$ . As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo  $\neq$  representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.

### 6.2.2- Análise dos níveis de IL-12

As Figuras 9 e 10 representam a análise comparativa entre os níveis de IL-12 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. Os painéis A e B (Figura 9 ou 10) ilustram os níveis de IL-12 na presença dos estímulos VSA e SLcA, respectivamente.

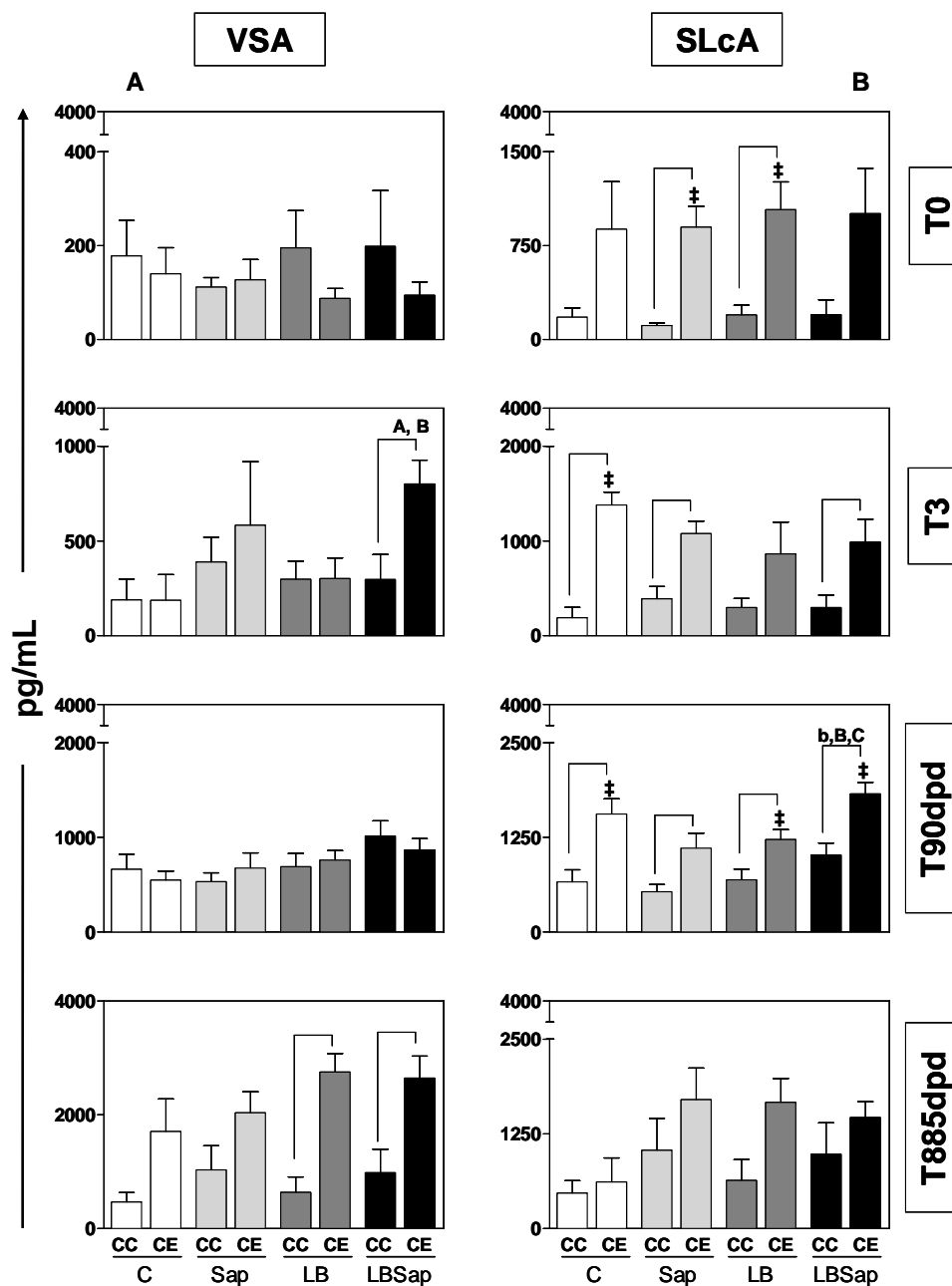
No tempo  $T_0$ , as culturas estimuladas com SLcA dos grupos Sap e LB apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-12 em relação às respectivas culturas controle e em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA (Figura 9A/B). De forma semelhante, as culturas estimuladas com SLcA dos grupos LBSal e LBSapSal apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de IL-12 quando comparadas às respectivas culturas controle e às respectivas culturas estimuladas com VSA (Figura 10B).

No tempo  $T_3$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-12 na cultura estimulada com VSA do grupo LBSap em relação à cultura controle e em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C e Sap (Figura 9A). De forma semelhante, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-12 na cultura estimulada com VSA do grupo LBSapSal em relação à respectiva cultura controle e em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C, Sal e LBSal (Figura 10A). Ainda no tempo  $T_3$  foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na produção de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C, Sap e LBSap (Figura 9B) e dos grupos Sal e LBSapSal (Figura 10B) em relação às respectivas culturas controle. Além disso, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis desta citocina na cultura estimulada com SLcA do grupo C (Figura 9A/B) e Sal (Figura 10A/B) em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA. O grupo LBSal apresentou ainda redução dos níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA em relação ao mesmo estímulo das culturas do grupo C (Figura 10B).

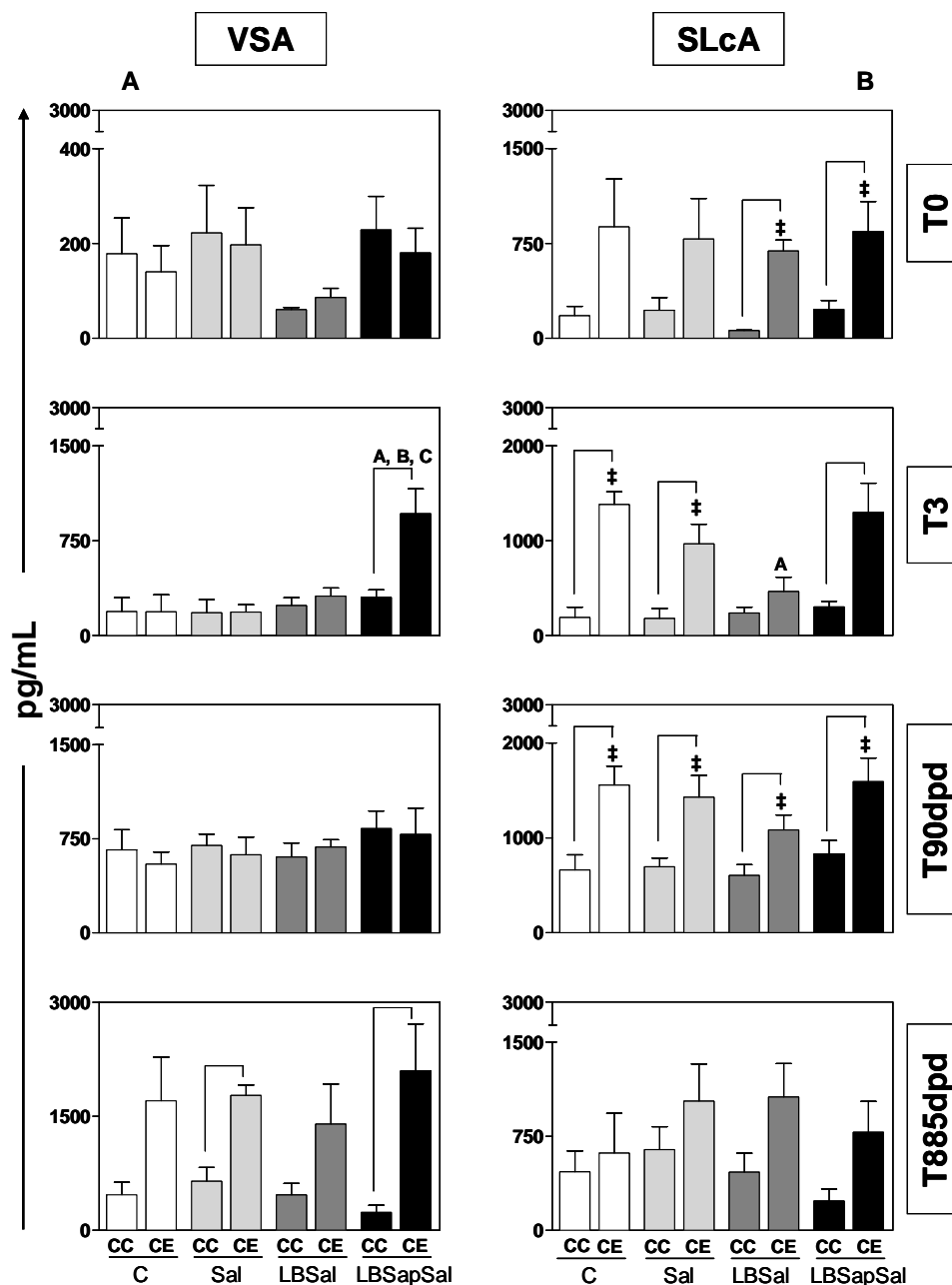
No tempo  $T_{90}$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C, Sap, LB, LBSap (Figura 9B) e Sal, LBSal, LBSapSal (Figura 10B) em relação às respectivas culturas controles. Além disso, houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos C, LB, LBSap (Figura 9A/B) e Sal, LBSal, LBSapSal (Figura 10A/B) em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA. Na cultura controle do grupo LBSap foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-12 em relação à cultura controle do grupo

C (Figura 9B). De forma interessante, apenas a cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de IL-12 em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos Sap e LB (Figura 9B).

A análise do tempo  $T_{885}$  revelou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-12, na presença de VSA, para os grupos LB, LBSap (Figura 9A) e Sal, LBSapSal (Figura 10A) quando comparadas às respectivas culturas controle.



**Figura 9:** Perfil de IL-12 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ◻), inoculados com *L. braziliensis* (LB; ◼) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-12. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo ≠ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



**Figura 10:** Perfil de IL-12 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), inoculados com saliva de *L. longipalpis* (Sal; □), inoculados com *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal; □) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IL-12. As linhas conectoras entre as culturas controle (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo # representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.

### 6.2.3- Análise dos níveis de IFN- $\gamma$

As Figuras 11 e 12 representam a análise comparativa entre os níveis de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente. Os painéis A e B (Figura 11 ou 12) ilustram os níveis de IFN- $\gamma$  na presença dos estímulos VSA e SLcA, respectivamente.

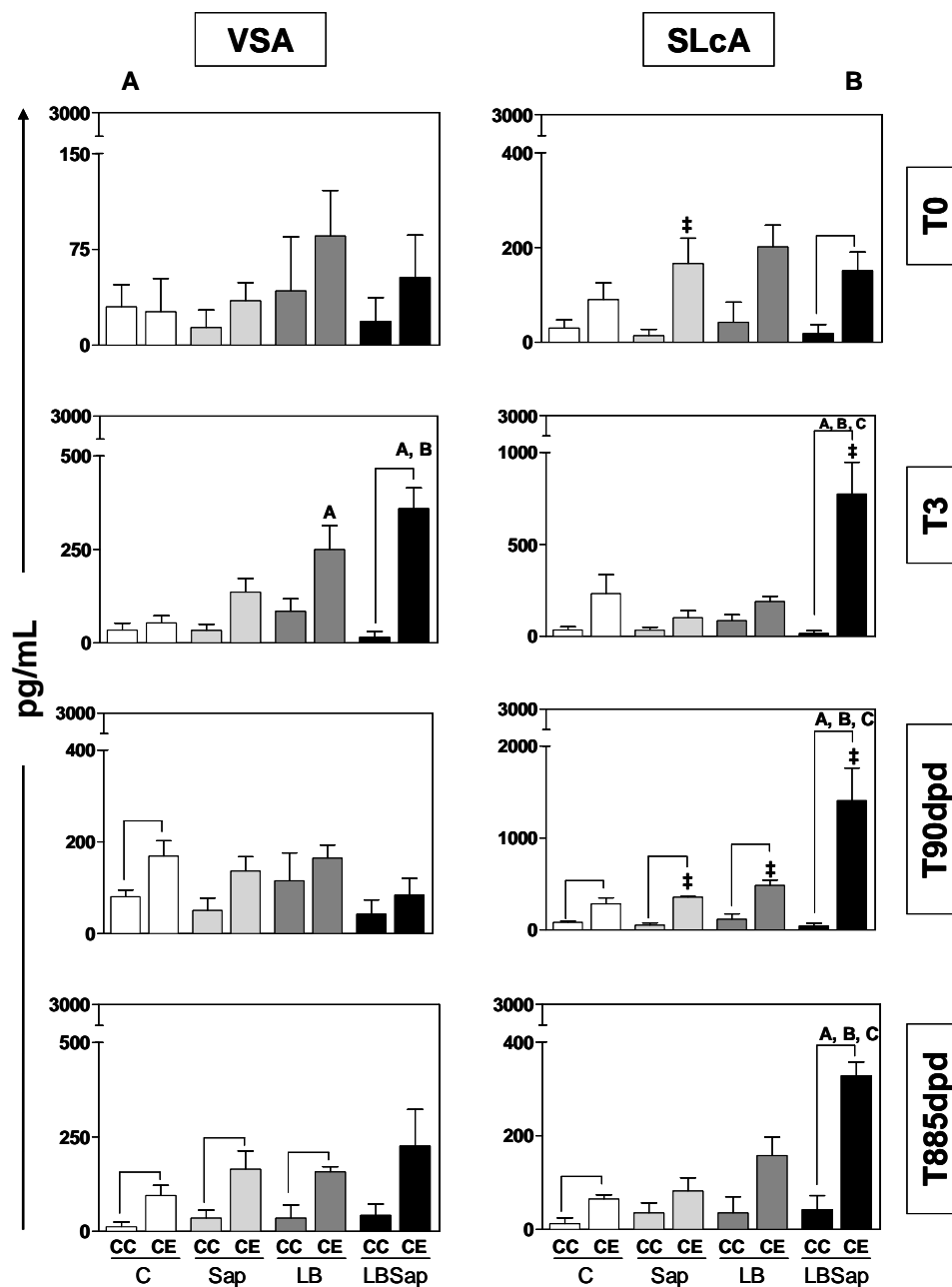
No tempo T<sub>0</sub>, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  na cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap (Figura 11B) e LBSapSal (Figura 12B) em relação às respectivas culturas controles. Além disto, foi observado que a cultura controle do grupo LBSal apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$ , na presença do SLcA, em relação a cultura controle do grupo Sal (Figura 12B). Também foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  na cultura estimulada com SLcA em relação à cultura estimulada com VSA do grupo Sap (Figura 11B).

No tempo T<sub>3</sub>, as culturas estimuladas com VSA dos grupos LBSap (Figura 11A) e LBSapSal (Figura 12A) apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  em relação às respectivas culturas controles. A cultura estimulada com VSA do grupo LB apresentou aumento significativo da quantidade de IFN- $\gamma$  em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo C (Figura 11A). Além disto, foi observado aumento significativo dos níveis de IFN- $\gamma$  na cultura estimulada com VSA do grupo LBSap em relação às culturas estimuladas com VSA dos grupos C e Sap (Figura 11A). Resultados semelhantes foram observados para o grupo LBSapSal, sendo encontrado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  na cultura estimulada com VSA em relação àquelas com o mesmo estímulo dos grupos C, Sal e LBSal (Figura 12A). Ainda em T<sub>3</sub>, mas na presença do SLcA, foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da quantidade desta citocina no grupo LBSap em relação à respectiva cultura controle e em relação à cultura estimulada com VSA (Figura 11A/B). Resultados semelhantes foram observados para o grupo LBSapSal, que, na presença do SLcA, apresentou aumento significativo de IFN- $\gamma$  em relação à respectivas culturas controle e estimulada com VSA e em relação às culturas com o mesmo estímulo dos grupos Sal e LBSal (Figura 12A/B). Além disto, foi observado que a cultura controle do grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da produção de IFN- $\gamma$  em relação à cultura controle do grupo C (Figura 12B).

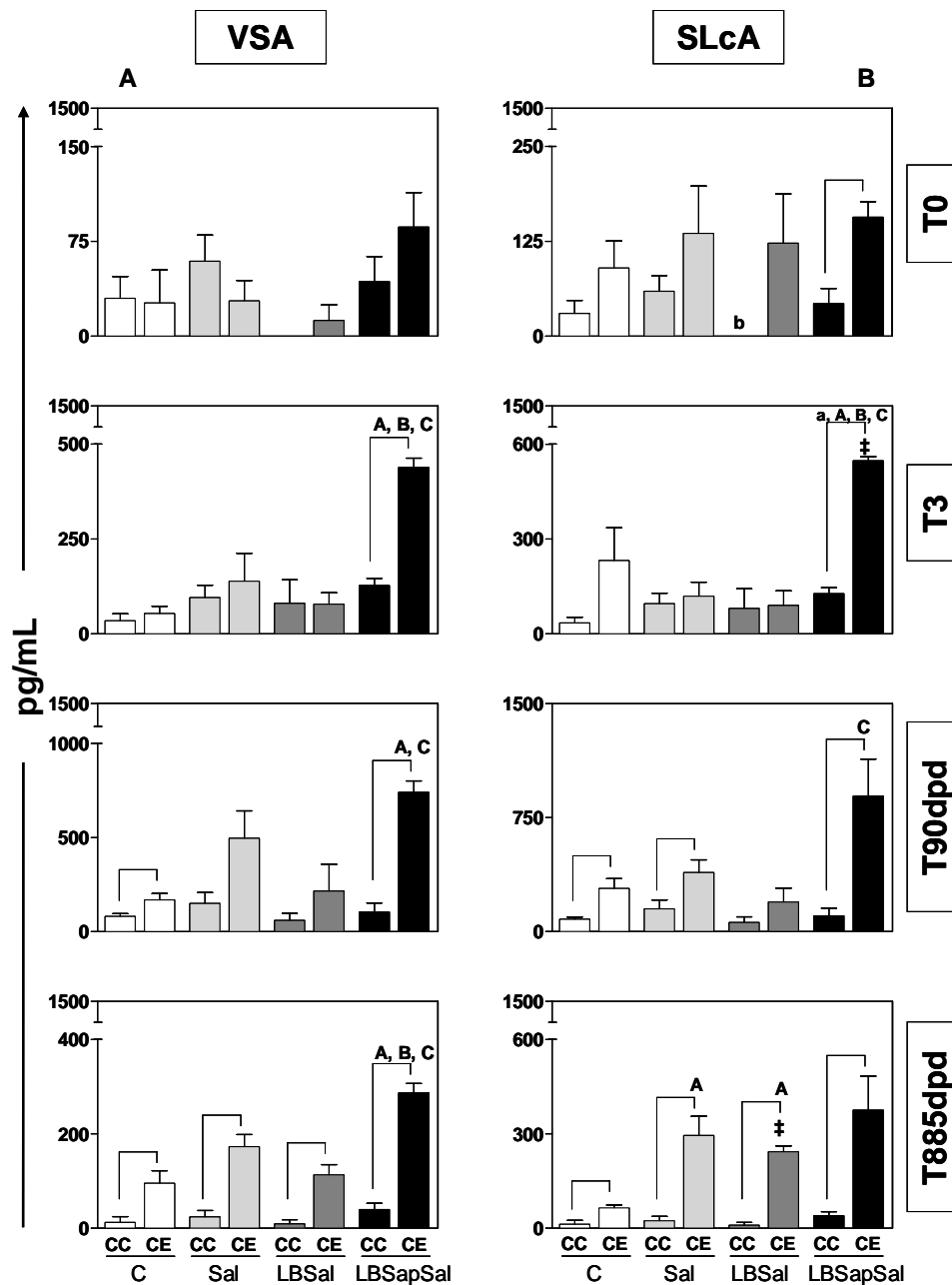
No tempo  $T_{90}$ , houve aumento significativo dos níveis de IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com VSA dos grupos C e LBSapSal em relação às respectivas culturas controles (Figura 12A). No grupo LBSapSal houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com VSA em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C e LBSal (Figura 12A). Já na presença do estímulo antigênico do SLcA, foi observado aumento significativo dos níveis de IFN- $\gamma$  nos grupos C, Sap, LB, LBSap (Figura 11B) e Sal, LBSapSal (Figura 12B) em relação às respectivas culturas controles em  $T_{90}$ . As culturas estimuladas com SLcA dos grupos Sap, LB e LBSap apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  em relação às respectivas culturas estimuladas com VSA (Figura 11A/B) em  $T_{90}$ . Além disso, neste tempo, a cultura estimulada com SLcA do grupo LBSap apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C, Sap e LB (Figura 11B). De forma semelhante, em  $T_{90}$ , a cultura estimulada com SLcA do grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) desta citocina em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo LBSal (Figura 12B).

No tempo  $T_{885}$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos níveis de IFN- $\gamma$  das culturas estimuladas com VSA em relação às respectivas culturas controle dos grupos C, Sap, LB (Figura 11A) e Sal, LBSal, LBSapSal (Figura 12A). De forma interessante, apenas o grupo LBSapSal apresentou ao final da avaliação ( $T_{885}$ ) aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com VSA em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C, Sal e LBSal (Figura 12A). Nas culturas estimuladas com SLcA foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis dessa citocina nos grupos C, LBSap (Figura 11B) e Sal, LBSal, LBSapSal (Figura 12B), em relação às respectivas culturas controles em  $T_{885}$ . Além disso, no grupo LBSal, a cultura estimulada com SLcA apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IFN- $\gamma$  em relação à respectiva cultura estimulada com VSA (Figura 12A/B). A análise entre as culturas estimuladas com SLcA revelou que no grupo LBSap houve aumento dos níveis dessa citocina em relação aos grupos C, Sap e LB, considerando as culturas com o mesmo tipo de estímulo (Figura 11B). Ainda no tempo  $T_{885}$ , foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos níveis de IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com SLcA dos grupos Sal e LBSal em relação às culturas com mesmo estímulo do grupo C (Figura 12B).





**Figura 11:** Perfil de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; □), inoculados com *L. braziliensis* (LB; ■) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap; ■). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IFN- $\gamma$ . As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo ≠ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



**Figura 12:** Perfil de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel esquerdo, A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel direito, B) dos diferentes grupos: controle (C; □), inoculados com saliva de *L. longipalpis* (Sal; ◻), inoculados com *L. braziliensis* associado à saliva de *L. longipalpis* (LBSal; ◼) e inoculados com *L. braziliensis* associado à saponina e saliva de *L. longipalpis* (LBSapSal; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em pg/mL de IFN- $\gamma$ . As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). O símbolo  $\neq$  representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as culturas estimuladas com VSA ou SLcA. As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.

### 6.3- Correlações entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos

Considerando as importantes alterações imunofenotípicas em linfócitos T e B verificadas em trabalhos anteriores do grupo (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a; Roatt, 2010; Aguiar-Soares, 2010), foi utilizada uma estratégia de análise estatística que possibilitou investigar possíveis relações entre as populações e subpopulações linfocitárias, bem como do perfil de ativação de linfócitos pela expressão de MHC-II<sup>+</sup> com o perfil de citocinas em diferentes tempos do protocolo vacinal. Estas análises foram realizadas em amostras submetidas a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) de CMSP de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal e seus constituintes vacinais. Desta forma, as análises de correlações entre o fenótipo de leucócitos *versus* perfil de citocinas foram realizadas considerando os dados referentes a todos os tempos avaliados (T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>90</sub>, T<sub>885</sub>) para cada parâmetro, nos diferentes grupos avaliados. Os dados estão representados na Tabela 2 e 3.

Foi observado que as culturas estimuladas com VSA do grupo C apresentaram correlações positivas entre os níveis de IL-10 e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0064$ ,  $r=0,6691$ ). Ainda no grupo C, na presença de SLcA foi observada correlação positiva entre os níveis de TGF- $\beta$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0490$ ,  $r=0,4991$ ) ou com a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0332$ ;  $r=0,4900$ ) (Tabelas 1 e 2)

Já nas culturas estimuladas com VSA do grupo Sap foram observadas correlações positivas entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0015$ ;  $r=0,7083$ ) e entre IL-10 e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0403$ ;  $r=0,5170$ ). Na presença de SLcA, correlações positivas foram observadas no grupo Sap entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0385$ ;  $r=0,4910$ ) e entre TNF- $\alpha$  e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0007$ ;  $r=0,7406$ ). Entretanto, foram observadas correlações negativas entre os níveis de IL-12 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0483$ ;  $r=-0,4713$ ) (Tabela 1).

Nas culturas estimuladas com VSA do grupo LB, foram observadas correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0222$ ,  $r=0,5347$ ), entre os níveis de IL-10 e a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0309$ ;  $r=0,4957$ ) e entre os níveis de IL-10 a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0084$ ;  $r=0,6166$ ). Já na presença de SLcA, no grupo LB foram observadas correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0336$ ;  $r=0,5169$ ), IFN- $\gamma$  e linfócitos T CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0330$ ;  $r=0,5343$ ) e entre

TNF- $\alpha$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0359$ ;  $r=0,5113$ ). Todavia, correlações negativas foram encontradas entre os níveis de IL-12 e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0329$ ;  $r=-0,5520$ ) (Tabela 1).

No grupo imunizado com LBSap, na presença de VSA, correlações positivas foram detectadas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0332$ ;  $r=0,5338$ ), TNF- $\alpha$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0208$ ;  $r=0,5712$ ), IFN- $\gamma$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0135$ ;  $r=0,6023$ ), IL-12 e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0498$ ;  $r=0,4976$ ) e entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0309$ ;  $r=0,5398$ ). Entretanto, correlações negativas foram observadas entre os níveis de IL-4 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0256$ ;  $r=-0,5556$ ), IL-4 e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0275$ ;  $r=-0,5185$ ) e entre IL-4 e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0074$ ;  $r=-0,6083$ ). Na presença de SLcA, foram observadas correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0196$ ;  $r=0,5756$ ), IL-12 e expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0013$ ;  $r=0,7485$ ) e entre IFN- $\gamma$  e expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0168$ ;  $r=0,5409$ ). Por outro lado, correlações negativas foram observadas entre os níveis de IL-4 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0427$ ;  $r=-0,5117$ ), IL-4 e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0203$ ;  $r=-0,5910$ ), TGF- $\beta$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0307$ ;  $r=-0,5579$ ) e entre os níveis de IL-4 e expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0088$ ;  $r=-0,6494$ ) (Tabela 1).

Já no grupo Sal, quando as culturas receberam estímulo com VSA, foram observadas correlações positivas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a expressão de e expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0001$ ;  $r=0,7696$ ) assim como entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0140$ ;  $r=0,5678$ ). Quando na presença de SLcA, correlações positivas foram observadas entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0224$ ;  $r=0,5343$ ). Todavia, correlações negativas foram encontradas entre os níveis de IL-12 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0161$ ;  $r=-0,5580$ ), IFN- $\gamma$  e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0361$ ;  $r=-0,5115$ ), e entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0475$ ;  $r=-0,4601$ ) (Tabela 2).

No grupo LBSal, quando as culturas foram estimuladas com VSA, houve correlação positiva entre a expressão de MHC-II em linfócitos e os níveis de TNF- $\alpha$  ( $P=0,0082$ ;  $r=0,5869$ ) ou de IL-10 ( $P=0,0030$ ;  $r=0,7300$ ) (Tabela 2).

Finalmente, no grupo LBSapSal, na presença de VSA, correlações positivas foram observadas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0295$ ;  $r=0,5277$ ), IFN- $\gamma$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0476$ ;  $r=0,4867$ ), TNF- $\alpha$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0461$ ;  $r=0,4755$ ), entre TNF- $\alpha$  e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0038$ ,  $r=0,6614$ ) e entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> ( $P<0,0001$ ;  $r=0,8434$ ). Por outro lado, correlações

negativas foram detectadas entre IL-4 e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0496$ ;  $r=-0,4981$ ), IL-10 e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0148$ ;  $r=-0,5793$ ), IL-4 e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0120$ ;  $r=-0,6108$ ). Na presença de SLcA, foram observadas correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0478$ ;  $r=0,4863$ ), IFN- $\gamma$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0465$ ;  $r=0,4748$ ) e entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> ( $P=0,0008$ ;  $r=0,7169$ ). Entretanto, foram observadas correlações negativas entre os níveis de IL-12 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0097$ ,  $r=-0,5770$ ), IL-4 e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0249$ ;  $r=-0,5263$ ), IL-10 e LT CD4<sup>+</sup> ( $P=0,0323$ ;  $r=-0,4922$ ), IL-4 e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0113$ ;  $r=-0,5671$ ), TGF- $\beta$  e LT CD8<sup>+</sup> ( $P=0,0427$ ;  $r=-0,5288$ ), e entre os níveis de IL-4 e a expressão de MHC-II em linfócitos ( $P=0,0006$ ;  $r=-0,7470$ ). Na ausência de estímulo, nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 2).

**Tabela 1:** Correlações significativas entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a vacina LBSap e seus componentes na presença de VSA ou SLcA

Grupo	Estímulo	Citocina	Marcador celular	P	R
C	VSA	IL-10	MHC-II	0,0064	0,6691
C	SLcA	TGF- $\beta$	LT CD8	0,049	0,4991
C	SLcA	TGF- $\beta$	MHC-II	0,0332	0,49
Sap	VSA	IL-10	LT CD4	0,0015	0,7083
Sap	VSA	IL-10	MHC-II	0,0403	0,517
Sap	SLcA	IL-12	LT CD4	0,0483	-0,4713
Sap	SLcA	IL-10	LT CD4	0,0385	0,491
Sap	SLcA	TNF- $\alpha$	MHC-II	0,0007	0,7406
LB	VSA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,0222	0,5347
LB	VSA	IL-10	LT CD8	0,0309	0,4957
LB	VSA	IL-10	MHC-II	0,0084	0,6166
LB	SLcA	IL-12	LT CD4	0,0329	-0,552
LB	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD4	0,0336	0,5169
LB	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,033	0,5343
LB	SLcA	TNF- $\alpha$	LT CD8	0,0359	0,5113
LBSap	VSA	TNF- $\alpha$	LT CD4	0,0332	0,5338
LBSap	VSA	TNF- $\alpha$	LT CD8	0,0208	0,5712
LBSap	VSA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,0135	0,6023
LBSap	VSA	IL-12	LT CD8	0,0498	0,4976
LBSap	VSA	IL-4	LT CD4	0,0206	-0,5556
LBSap	VSA	IL-4	LT CD8	0,0275	-0,5185
LBSap	VSA	TNF- $\alpha$	MHC-II	0,0309	0,5398
LBSap	VSA	IL-4	MHC-II	0,0074	-0,6083
LBSap	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,0196	0,5756
LBSap	SLcA	IL-4	LT CD4	0,0427	-0,5117
LBSap	SLcA	IL-4	LT CD8	0,0203	-0,591
LBSap	SLcA	TGF- $\beta$	LT CD8	0,0307	-0,5579
LBSap	SLcA	IL-12	MHC-II	0,0013	0,7495
LBSap	SLcA	IFN- $\gamma$	MHC-II	0,0168	0,5409
LBSap	SLcA	IL-4	MHC-II	0,0088	-0,6494

**Tabela 2:** Correlações significativas entre o perfil de citocinas e o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) ou expressão de MHC-II em linfócitos em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a vacina LBSapSal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA

Grupo	Estímulo	Citocina	Marcador celular	P	R
C	VSA	IL-10	MHC-II	0,0064	0,6691
C	SLcA	TGF- $\beta$	LT CD8	0,049	0,4991
C	SLcA	TGF- $\beta$	MHC-II	0,0332	0,49
Sal	VSA	TNF- $\alpha$	MHC-II	0,0001	0,7696
Sal	VSA	IFN- $\gamma$	MHC-II	0,014	0,5678
Sal	SLcA	IL-12	LT CD4	0,0161	-0,558
Sal	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD4	0,0361	-0,511
Sal	SLcA	IL-10	LT CD4	0,0475	-0,4601
Sal	SLcA	IL-10	LT CD8	0,0224	0,5343
LBSal	VSA	TNF- $\alpha$	MHC-II	0,0082	0,5869
LBSal	VSA	IL-10	MHC-II	0,003	0,73
LBSapSal	VSA	IFN- $\gamma$	LT CD4	0,0295	0,5277
LBSapSal	VSA	TNF- $\alpha$	LT CD8	0,0461	0,4755
LBSapSal	VSA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,0476	0,4867
LBSapSal	VSA	IL-4	LT CD4	0,0496	-0,4981
LBSapSal	VSA	IL-10	LT CD8	0,0148	-0,5793
LBSapSal	VSA	TNF- $\alpha$	MHC-II	0,0038	0,6614
LBSapSal	VSA	IFN- $\gamma$	MHC-II	<0,0001	0,8434
LBSapSal	VSA	IL-4	MHC-II	0,012	-0,6108
LBSapSal	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD4	0,0478	0,4863
LBSapSal	SLcA	IL-12	LT CD4	0,0097	-0,577
LBSapSal	SLcA	IFN- $\gamma$	LT CD8	0,0465	0,4748
LBSapSal	SLcA	IL-4	LT CD4	0,0249	-0,5263
LBSapSal	SLcA	IL-10	LT CD4	0,0323	-0,4922
LBSapSal	SLcA	IL-4	LT CD8	0,0113	-0,5671
LBSapSal	SLcA	TGF- $\beta$	LT CD8	0,0427	-0,5288
LBSapSal	SLcA	IFN- $\gamma$	MHC-II	0,0008	0,7169
LBSapSal	SLcA	IL-4	MHC-II	0,0006	-0,747

#### 6.4- Avaliação dos Níveis de Óxido Nítrico

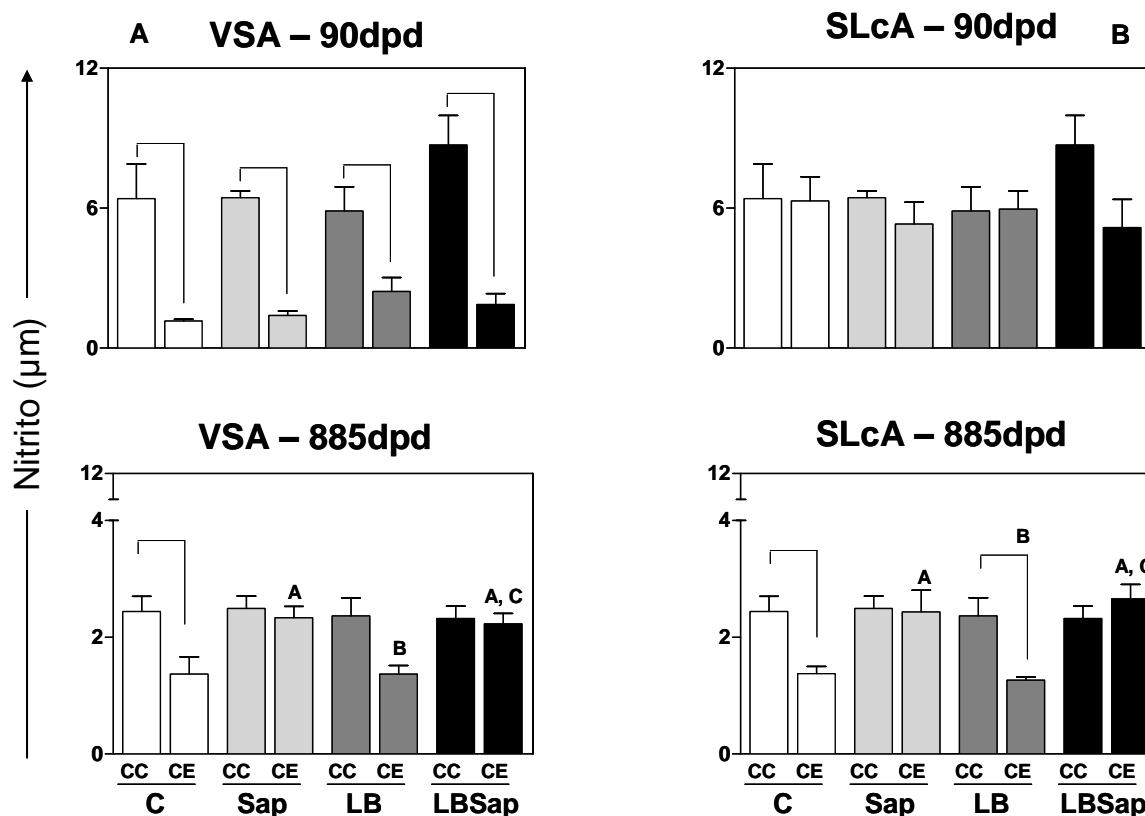
É consenso na literatura a relevância do óxido nítrico (NO) no controle de patógenos intracelulares. Sendo assim, foi feita uma análise indireta dos níveis de NO, através da análise de nitrito, em sobrenadante de CMSP de cães imunizados com LBSap ou LBSapSal nos tempos T<sub>90</sub> e T<sub>885</sub>, na presença ou ausência de estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) (Figuras 13-14, A/B).

No tempo T<sub>90</sub> foi observado redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de NO nas culturas estimuladas com VSA em relação às respectivas culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap (Figura 13A). Nos grupos LBSal e LBSapSal, também houve redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de NO nas culturas estimuladas com VSA em relação às respectivas culturas controle (Figura 14A). A cultura estimulada com VSA do grupo Sal apresentou níveis de NO significativamente ( $P < 0,05$ ) maiores que a cultura com mesmo estímulo do grupo C e LBSal (Figura 14A). A cultura estimulada com VSA do grupo LBSapSal apresentou níveis de NO significativamente ( $P < 0,05$ ) maiores que as culturas com mesmo estímulo dos grupos C e LBSal (Figura 14A). Na cultura controle do grupo LBSapSal houve aumento significativo dos níveis de NO em relação à cultura controle do grupo Sal (Figura 14A).

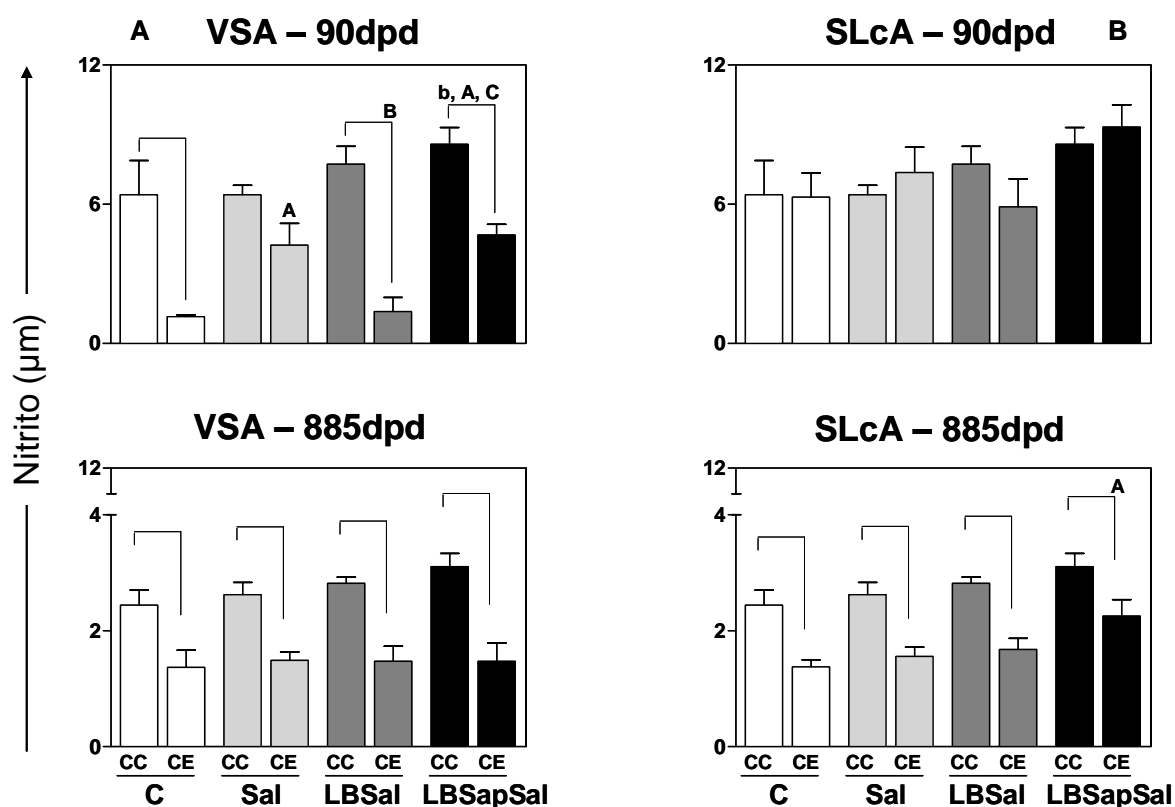
No tempo T<sub>885</sub> foi observada redução dos níveis de NO, nas culturas estimuladas com VSA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal em relação às respectivas culturas controles (Figura 14A). Neste mesmo tempo houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis de NO na cultura estimulada com VSA do grupo Sap em relação à cultura com mesmo estímulo dos grupos C e LB (Figura 13A). Além disto, no grupo LBSap, a cultura estimulada com VSA apresentou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de NO em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C e LB (Figura 13A). As culturas estimuladas com SLcA dos grupos C e LB apresentaram redução significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de NO quando comparadas às respectivas culturas controle (Figura 13B). No grupo Sap, foi observado aumento de NO na cultura estimulada com SLcA em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C e LB (Figura 13B). De forma interessante, no grupo LBSap houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de NO na cultura estimulada com SLcA em relação às culturas com mesmo estímulo dos grupos C e LB (Figura 13B). No entanto, as culturas estimuladas com SLcA dos grupos Sal, LBSal e LBSapSal também apresentaram redução significativa de NO quando comparadas às respectivas culturas controle (Figura 14B). No



grupo LBSapSal, a cultura estimulada com SLcA apresentou aumento significativo dos níveis de NO em relação à cultura com mesmo estímulo do grupo C (Figura 14B).



**Figura 13:** Níveis de óxido nítrico avaliados em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ◻), vacina de *L. braziliensis* (LB; ◼) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em  $\mu\text{M}$  de nitrito. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sap, LB e LBSap, respectivamente.



**Figura 14:** Níveis de óxido nítrico avaliados em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA ou SLcA em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio com *L. chagasi*. Os resultados estão apresentados considerando estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel A) ou estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel B) dos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ◻), vacina de *L. braziliensis* (LB; ◼) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ◼). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da concentração em  $\mu\text{M}$  de nitrito. As linhas conectoras entre as culturas controles (CC) e culturas estimuladas (VSA ou SLcA) representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As letras a, b, c e d representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas controle dos diferentes grupos com culturas controle dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente. As letras A, B, C e D representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos diferentes grupos com culturas estimuladas com VSA ou SLcA dos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, respectivamente.

### 6.5- Correlações entre os níveis de citocinas e óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA

A produção de NO é um fator altamente relevante a ser considerado durante o processo de infecção por *Leishmania*, tendo em vista seu papel na eliminação do parasito. Buscando investigar a relação entre os níveis de óxido nítrico com o perfil de citocinas foram feitas correlações entre estes parâmetros. Os dados estão representados na Tabela 3.

Assim, no grupo Sap, na presença de VSA, foi observada correlação positiva entre os níveis de IL-10 e NO ( $P=0,0438$ ,  $r=0,04940$ ).

Já nas culturas estimuladas com VSA do grupo LB, foram detectadas correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO ( $P=0,0400$ ;  $r=0,5022$ ). Por outro lado, foi detectada correlação negativa entre os níveis de IL-4 e NO ( $P=0,0457$ ;  $r=-0,5057$ ). Já na presença de SLcA, houve correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO ( $P=0,0082$ ;  $r=0,6537$ ).

De maneira interessante foi detectada correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO no grupo imunizado com LBSap, na presença de SLcA ( $P=0,0304$ ;  $r=0,5586$ ). Além disso, houve correlação negativa entre IL-4 e NO ( $P<0,0001$ ;  $r=-0,8759$ ).

De forma semelhante, no grupo LBSal, na presença de SLcA, foi observada correlação positiva entre os níveis de TNF- $\alpha$  e NO ( $P=0,0008$ ;  $r=0,7197$ ).

Outra observação interessante foi a detecção de correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO, nas culturas estimuladas com VSA do grupo imunizado com LBSapSal ( $P=0,0052$ ;  $r=0,6809$ ). Além disso, na presença de SLcA, foi observada correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO ( $P=0,0024$ ;  $r=0,7207$ ) e entre TNF- $\alpha$  e NO ( $P=0,0014$ ;  $r=0,7464$ ). Por outro lado, foi observada correlação negativa entre os níveis de IL-4 e NO ( $P=0,0033$ ;  $r=-0,6868$ ).

**Tabela 3-** Correlações entre os níveis de citocinas e óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSap Sal e seus componentes na presença de VSA ou SLcA

Grupo	Estímulo	Citocina	P	r
Sap	VSA	IL-10	0,0438	0,494
LB	VSA	IFN- $\gamma$	0,04	0,5022
LBSapSal	VSA	IFN- $\gamma$	0,0052	0,6809
LB	SLcA	IFN- $\gamma$	0,0082	0,6537
LBSap	SLcA	IFN- $\gamma$	0,0334	0,5586
LBSap	SLcA	IL-4	<0,0001	-0,8759
LBSal	SLcA	TNF- $\alpha$	0,0008	0,7197
LBSapSal	SLcA	TNF- $\alpha$	0,014	0,7464
LBSapSal	SLcA	IFN- $\gamma$	0,0024	0,7207
LBSapSal	SLcA	IL-4	0,0033	-0,6868

#### 6.6- Determinação da carga parasitária em medula óssea através do método *Leishman Donovan Units* (LDU)

Com o objetivo de verificar se as vacinas LBSap e LBSapSal conferiram proteção aos cães imunizados, foi feita a determinação da carga parasitária em todos os grupos experimentais, através do método LDU, em medula óssea, no tempo 885 dias após o desafio com *L. chagasi*. A pesquisa de formas amastigotas em lâminas coradas pelo *Giemsa* revelou a ausência de parasitismo na medula óssea (Tabela 4).

**Tabela 4-** Avaliação parasitológica de cães vacinados com LBSap e LBSapSal e desafiados com *L. chagasi* através da técnica LDU realizada 885dpd

<b>Grupos</b>	<b>Esfregaço Medula Óssea</b>
<b>C (n=5)</b>	Negativo
<b>Sap (n=5)</b>	Negativo
<b>LB (n=5)</b>	Negativo
<b>Sal (n=5)</b>	Negativo
<b>LBSal (n=5)</b>	Negativo
<b>LBSap (n=5)</b>	Negativo
<b>LBSapSal (n=5)</b>	Negativo

## **7. Discussão**

O aumento do número de casos de LV no mundo e, principalmente no Brasil, tem motivado estudos e avaliações de vacinas anti-LVC, tendo em vista a importância epidemiológica do cão no ciclo biológico do parasito. Para orientar a busca racional de vacinas anti-LVC, tem sido desenvolvido estudos para identificar biomarcadores de imunogenicidade antes e após desafio com agente etiológico (Reis *et al.*, 2010). Neste sentido, é altamente relevante o desenvolvimento de ferramentas metodológicas que contribuam para estudos de imunogenicidade, tais como o uso da citometria de fluxo para imunofenotipagem de leucócitos caninos (Fujiwara *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2005). Esta metodologia permitiu a identificação de biomarcadores de resistência e susceptibilidade relacionados ao curso da história natural da LVC (Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006b; Giunchetti *et al.*, 2008a; Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Desta forma, as avaliações de alterações imunopatológicas na LVC foram incorporadas como importantes estratégias que determinaram o emprego de diferentes biomarcadores nas avaliações de imunogenicidade vacinal anti-LVC (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Estes estudos indicaram a presença de biomarcadores determinantes para conferir um padrão de resistência frente à infecção por *L. chagasi* em cães, entre os quais: (i) aumento dos níveis de linfócitos T (CD5<sup>+</sup>) e suas subpopulações (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) e monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes ou submetidos ao cultivo com antígeno de *Leishmania*; (ii) baixos níveis de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 e aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ; (iii) baixos níveis de anticorpos *Leishmania*-específicos; (iv) manutenção de uma baixa carga parasitária em diferentes tecidos (Pinelli *et al.*, 1994; Pinelli *et al.*, 1999; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Giunchetti, 2004; Chamizo *et al.*, 2005; Giunchetti *et al.*, 2006; Giunchetti *et al.*, 2008a; Alves *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009; Panaro *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010; Boggiatto *et al.*, 2010; Coura-Vital *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2011).

Mais recentemente, com a disponibilidade de reagentes específicos para análise do perfil de citocinas do tipo 1, tipo 2 e imunomodulatórias, tornou-se possível a incorporação desta abordagem em ensaios clínicos vacinais anti-LVC (Carrilo *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2008; de Lima *et al.*, 2010).

Os estudos das vacinas desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa (LBSap e LBSapSal) revelaram grande potencial imunogênico por induzirem aumento dos níveis de linfócitos T (CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) circulantes, bem como de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> *Leishmania*-específicos (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a; Roatt, 2010; Aguiar-Soares, 2010). Além disto, as vacinas LBSap e LBSapSal

apresentam-se inócuas e seguras para a administração sem causar lesões ulcerativas no local do inóculo (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008d; Moreira *et al.*, 2008; Vitoriano-Souza, 2008). Sendo assim, tornou-se fundamental a ampliação destes estudos buscando avaliar o perfil de citocinas induzidas pelas imunizações antes e após o desafio com *L. chagasi*, o que constitui a principal abordagem deste trabalho.

Dessa forma, no presente estudo foi realizada a análise do perfil de citocinas do tipo 1, tipo 2 e imunomodulatórias em sobrenadante de cultura de CMSP de cães antes e após a imunização e desafio com *L. chagasi*.

Entre os principais resultados decorrentes da avaliação de citocinas do tipo 2 e imunomodulatórias, foi observado que cães imunizados com a vacina LBSap apresentaram aumento dos níveis de IL-4 nas culturas estimuladas com SLcA em T<sub>3</sub> (Figura 1B). Além disto, este padrão de resposta foi mantido no período precoce pós desafio com *L. chagasi* (T<sub>90</sub>) na presença de ambos os estímulos (VSA e SLcA) no grupo LBSap (Figura 1A/B). No tempo tardio pós desafio (T<sub>885</sub>) houve uma reversão na produção de IL-4 das culturas estimuladas do grupo LBSap, retornando a valores similares aos observados nas culturas controles (Figura 1B). Estes resultados parecem indicar a presença de IL-4 logo após o protocolo de imunização, persistindo até o período precoce pós desafio (T<sub>90</sub>) induzidos pela vacina LBSap. No entanto, as culturas não estimuladas do grupo LBSap apresentaram níveis de IL-4 significativamente inferiores em relação as mesmas culturas do grupo LB no período tardio pós desafio (T<sub>885</sub>). Este resultado poderia indicar que a manutenção de menores níveis de IL-4 estaria associada à presença do adjuvante saponina durante o protocolo de imunização, permitindo com que mesmo após 885 dias do desafio com *L. chagasi*, a infecção experimental não fosse suficiente para induzir a produção de IL-4 por CMSP de cães vacinados com LBSap. Considerando que o estabelecimento de imunidade vacinal induzindo proteção está relacionada a uma complexa rede de interações da resposta imune, este trabalho propôs estratégias de correlações entre as diferentes variáveis analisadas. Neste sentido, foram realizadas análises de correlação entre os níveis de IL-4 e o fenótipo de CMSP cultivadas *in vitro*. Sendo assim, foi observado no grupo LBSap, que na presença de VSA, o percentual de LT CD4<sup>+</sup>, bem como o percentual de LT CD8<sup>+</sup> e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos foram negativamente correlacionados aos níveis de IL-4 provenientes do sobrenadante de cultura de CMSP (Tabela 1). Adicionalmente, também foi observada correlação negativa, na presença SLcA, entre os níveis de IL-4 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ou LT CD8<sup>+</sup>, bem como a expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos



(Tabela 1). Diante destes resultados, é possível propor a hipótese de que o aumento nos níveis de LT CD4<sup>+</sup> ou LT CD8<sup>+</sup>, bem como expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos já descritos na vacina LBSap (Giunchetti *et al.*, 2007, Roatt, 2010) estariam relacionados com os níveis de IL-4, indicando a participação concomitante destes biomarcadores. De forma interessante, Manna *et al.* (2008) propuseram que mesmo na presença de IL-4, mas com elevação de IFN- $\gamma$ , é possível manter um padrão de resistência na LVC com redução do parasitismo. Além disso, foi observado por Reis *et al.* (2006b) que o aumento de linfócitos T (CD5<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>) e da expressão de MHC-II em linfócitos do sangue periférico consiste em importantes biomarcadores associados ao controle do parasitismo. Dessa forma, as correlações negativas encontradas entre os níveis de IL-4 e estes biomarcadores de resistência permite sugerir a ocorrência de um possível estabelecimento de perfil de resistência induzido pela vacinação com LBSap. Por outro lado, a imunização com a vacina LBSapSal induziu uma redução dos níveis de IL-4 no período precoce pós desafio (T<sub>90</sub>) nas culturas de CMSP estimuladas com SLcA (Figura 2B). Além disto, foi observada na vacina LBSapSal correlação negativa entre os níveis de IL-4 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ou expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos na presença de VSA ou de SLcA (Tabela 2), bem como desta citocina e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> na presença de SLcA (Tabela 2). Roatt (2010) e Aguiar-Soares (2010) descreveram em cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal e desafiados com *L. chagasi*, respectivamente, apresentam aumento dos níveis de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>, bem como aumento da atividade linfoproliferativa, ambos, em cultivo de CMSP na presença de antígenos de *Leishmania*. Araújo (2006), Araújo *et al.* (2008) e Araújo *et al.* (2009) relataram que a imunização de cães com uma vacina constituída por antígenos brutos de *L. amazonensis* associada ao BCG como adjuvante foi capaz de induzir aumento da frequência de LT CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em culturas de CMSP não estimuladas. De forma interessante, quando foram feitas análise de correlação entre os níveis de NO e IL-4, foram observadas correlações negativas nos grupos vacinados com LBSap e LBSapSal, corroborando com a hipótese de que estas vacinas poderiam induzir resistência à infecção (Tabela 3). É importante ressaltar que estudos anteriores identificaram a presença de IL-4 em esplenócitos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* com ou sem sinais clínicos da doença indicando que esta citocina seria um dos biomarcadores presente durante o curso da infecção na LVC (Lage *et al.*, 2007). Além disto, Alves (2008) ao pesquisarem o papel de IL-4 em linfonodo e medula óssea não

lograram êxito em relacionar esta citocina com um perfil de resistência ou susceptibilidade à infecção na LVC.

A avaliação dos níveis de IL-10 mostrou tendência de aumento em T<sub>0</sub> nas culturas estimuladas com SLcA (Sap, LB, Sal, LBSal e LBSap, LBSapSal) (Figuras 3B e 4B), sendo esta alteração significativa apenas no grupo C (Figura 3B). Estes resultados parecem indicar que o estímulo de SLcA em CMSP de cães induziria aumento dos níveis de IL-10, independente do protocolo de imunização ou da infecção experimental. De fato, tem sido relatado que o antígeno de *L. chagasi* ou *L. infantum* seria capaz de induzir a produção concomitante por CMSP de IL-10 e IFN- $\gamma$  tanto na LV humana ativa (Peruhype-Magalhaes *et al.*, 2006) como na LVC experimental (Travi *et al.*, 2009). No entanto, em T<sub>3</sub>, estas diferenças foram menos acentuadas, particularmente quando houve associação do antígeno vacinal (*L. braziliensis*) nas diferentes composições (LBSal, LBSap, LBSapSal) (Figuras 3-4, B). Além disto, após o término do protocolo vacinal (T<sub>3</sub>) do grupo LBSap foi observado aumento dos níveis de IL-10 nas culturas estimuladas com SLcA em relação às estimuladas com VSA (Figura 3A/B). Este resultado parece reforçar a hipótese de indução da produção de IL-10 ser antígeno-específico, com exacerbação da produção desta citocina na presença do estímulo proveniente de *L. chagasi*. Por outro lado, neste mesmo tempo (T<sub>3</sub>) foi observada redução dos níveis de IL-10 no grupo LBSap e LBSal na presença de VSA (Figura 3-4, A). Estes dados parecem indicar que na presença do antígeno vacinal (VSA), o antígeno de *L. braziliensis* em associação com adjuvante saponina (LBSap) ou com saliva de flebotomíneos (LBSal) seria capaz de reduzir a produção de IL-10 em relação a imunização apenas com antígenos de *L. braziliensis* (LB). De forma semelhante, no período tardio pós desafio (T<sub>885</sub>) foi observado nas culturas não estimuladas aumento dos níveis de IL-10 no grupo LB e queda dos níveis de IL-10 no grupo LBSap (Figura 3B). Desta forma, estes dados sugerem que em culturas não estimuladas, o inóculo com o componente vacinal LB isoladamente induz maiores níveis de IL-10, que é revertido pela associação com saponina (grupo LBSap). Tal fato poderia ser justificado neste período (T<sub>885</sub>) pelo processo de infecção experimental por *L. chagasi*, estimulando os linfócitos circulantes do grupo LB a produzirem IL-10, mesmo na ausência de estímulo *in vitro*. De forma interessante, no período tardio pós desafio (T<sub>885</sub>) todos os grupos experimentais apresentaram tendência de aumento de IL-10 nas culturas estimuladas com SLcA em relação as respectivas culturas controles, sendo significativo apenas para os grupos LBSal e LBSap (Figura 3-4, B). Desta forma, é possível especular que este resultado poderia

refletir a na característica do próprio SLcA de induzir níveis elevados de IL-10, mesmo na ausência do protocolo vacinal e/ou desafio experimental, como observado em T<sub>0</sub>, ou ainda ser reflexo do processo da infecção experimental. Panaro *et al.* (2009) relataram em CMSP estimuladas com *L. infantum* produziram elevados níveis de IL-10 em cães sintomáticos comparados aos assintomáticos. De forma semelhante, CMSP de cães experimentalmente infectados por *L. chagasi* e estimuladas com SLcA são capazes de produzir elevados níveis de IL-10 (Fernandes *et al.*, 2008). Estes resultados apontam para um importante papel da IL-10 no estabelecimento ou progressão da doença.

As análises de correlação entre o perfil imunofenotípico de CMSP e os níveis de IL-10 revelaram a presença de correlações que podem contribuir para a identificação de eventos relacionados a resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. chagasi*. Neste sentido, foram observadas correlações positivas entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> no grupo Sap (Tabela 1) e entre os níveis de IL-10 e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> no grupo Sal (Tabela 2). Estes resultados poderiam indicar a contribuição das populações de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> na produção de IL-10, nos grupos Sap e Sal, respectivamente. Por outro lado, no grupo Sal, na presença de SLcA, foram observadas correlações negativas entre os níveis de IL-10 e LT CD4<sup>+</sup> (Tabela 2), reforçando a hipótese de participação de LT CD8<sup>+</sup> na produção desta citocina para o grupo Sal. De fato, Holaday (2000) observou em CMSP de pacientes com LV ativa intensa produção de IL-10 por LT CD8<sup>+</sup> associado a baixos níveis de IFN- $\gamma$ . Desta forma, foi proposto que para a progressão da LV humana, a população de LT CD8<sup>+</sup> apresentaria maior importância que LT CD4<sup>+</sup> na produção de IL-10 com consequente evolução da infecção (Holaday, 2000). Além disto, foi observado no grupo LBSapSal, correlação negativa entre os níveis de IL-10 tanto com a frequência de LT CD4<sup>+</sup> como com a frequência de LT CD8<sup>+</sup> (Tabela 2). Considerando que a imunização com LBSapSal induz o aumento de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Giunchetti *et al.*, 2008a; Aguiar-Soares, 2010), os dados descritos acima parecem indicar que a imunização com LBSapSal induziria uma menor produção de IL-10 por estes tipos celulares. Por outro lado, é importante ressaltar que foram observadas correlações positivas entre os níveis de IL-10 nos grupos C (em relação a expressão de MHC-II em linfócitos), Sap (em relação a frequência de LT CD4<sup>+</sup> ou expressão de MHC-II em linfócitos), LB (em relação a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ou expressão de MHC-II em linfócitos) (Tabela 1) e LBSal (em relação a expressão de MHC-II em linfócitos) (Tabela 2). Adicionalmente, as análises de correlação entre os níveis de IL-10 e NO mostraram correlações negativas no grupo

inoculado apenas com saponina (Sap) (Tabela 3). Estes resultados permitem propor a hipótese da associação de IL-10 com populações celulares que tradicionalmente vem sendo descritas como importantes no controle da infecção na LVC (Reis *et al.*, 2009). Neste sentido, é possível especular que o grupo LBSapSal apresentaria um perfil associado a resistência à infecção, de forma contrária ao observado nos grupos C, Sap, LB e LBSal. De acordo com Lage *et al.* (2007), os níveis de IL-10 apresentam correlação positiva com a progressão da doença na LVC. Além disso, cães com elevado parasitismo esplênico apresentam maiores níveis de IL-10 neste tecido que os animais com baixo e médio parasitismo, bem como os não infectados. De forma semelhante, altos níveis de IL-10 foram detectados no fígado (Alves, 2008) e linfonodo (Alves, 2008; Alves *et al.*, 2009) de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* da forma sintomática e com elevado parasitismo nestes órgãos. Boggiatto *et al.*, (2010) observaram que a progressão da LVC está relacionada ao aumento de IL-10 e a redução de IFN- $\gamma$ . De fato, Fernandes *et al.* (2008) propuseram que a presença de IL-10 associada a baixos níveis de IFN- $\gamma$  poderia representar um perfil mais relacionado a susceptibilidade à infecção por *L. chagasi*. Assim, cães vacinados com antígeno recombinante A2 apresentaram aumento de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10, compatível com um perfil imune associado a resistência à infecção na LVC (Fernandes *et al.*, 2008). Estes resultados corroboram com a hipótese de que a citocina IL-10 tem um papel importante na morbidade durante a evolução da infecção por *L. chagasi* em cães.

A análise dos níveis de TGF- $\beta$  revelaram redução da produção desta citocina nos grupos imunizados com LBSap e LBSapSal no período precoce pós desafio com *L. chagasi* (T<sub>90</sub>), nas culturas estimuladas com SLCa (Figuras 5-6). No grupo imunizado com LBSapSal, esta redução foi mantida no tempo tardio pós desafio (T<sub>885</sub>) (Figura 6). Estes resultados sugerem que após desafio experimental com *L. chagasi* há redução dos níveis de TGF- $\beta$  tanto para LBSap (T<sub>90</sub>) quanto para LBSapSal (T<sub>90</sub>, T<sub>885</sub>). Além disso, no grupo C, correlações positivas foram observadas entre os níveis de TGF- $\beta$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup>, bem como entre os níveis desta citocina e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> (Tabela 1). De forma interessante, a presença de TGF- $\beta$  tem sido determinante para induzir um estado de imunossupressão durante o curso da leishmaniose visceral (Virmondes-Rodrigues *et al.*, 1998; Kaye *et al.*, 2004). É importante ressaltar que a presença de TGF- $\beta$  *in vitro* tem efeito protetor para amastigotas em macrófagos, favorecendo a manutenção do parasitismo

(Gantt *et al.*, 2003). Assim, é possível especular que o grupo C apresente um perfil mais relacionado a susceptibilidade à infecção por apresentar aumento dos níveis de TGF- $\beta$  e por esta citocina estar diretamente correlacionada a biomarcadores considerados de resistência na LVC (LT CD8<sup>+</sup> e expressão de MHC-II em linfócitos). Já os grupos vacinados, tanto com LBSap quanto LBSapSal, apresentaram correlações negativas entre os níveis de TGF- $\beta$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> (Tabelas 1 e 2). Tem sido descrito a imunização com as vacinas LBSap e LBSapSal é capaz de induzir um aumento nos níveis de LT CD8<sup>+</sup> *ex vivo* e *in vitro* *Leishmania*-específicos (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a), permanecendo elevados mesmo após o desafio experimental com *L. chagasi* (Roatt, 2010; Aguiar-Soares, 2010). Alves (2008) e Alves *et al.* (2009), relataram altos níveis de TGF- $\beta$  associados ao aumento da carga parasitária na medula óssea, baço, pele e linfonodos de cães sintomáticos, concluindo que TGF- $\beta$  é uma citocina associada a morbidade na LVC. Neste contexto, é possível propor que as correlações negativas entre os níveis de TGF- $\beta$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> poderiam indicar o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores nos grupos imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal. Por outro lado, as correlações positivas entre estes parâmetros no grupo C poderiam indicar uma maior susceptibilidade à infecção experimental por *L. chagasi*. De fato, tem sido observado que os linfócitos T seriam importantes fontes produtoras de TGF- $\beta$  favorecendo a inibição de efeito microbicida por macrófagos (Kaye *et al.*, 2004).

A análise de citocinas do tipo 1 tem sido considerada como um pré-requisito para compor análises de imunogenicidade antes e após o desafio experimental com *L. chagasi* em ensaios clínicos vacinais anti-LVC (Reis *et al.*, 2010). Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ . Foi observado em T<sub>0</sub>, nas culturas estimuladas com SLcA, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em relação às respectivas culturas não estimuladas, sendo este aumento significativo nos grupos C, LB e LBSapSal (Figuras 7-8, B). Além disso, nestes grupos foi observado em T<sub>0</sub> que as culturas estimuladas com SLcA apresentaram aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  em relação às culturas estimuladas com VSA de cada grupo (Figuras 7-8, A/B). Estes resultados parecem indicar que o estímulo com SLcA induz aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , apontando para uma característica inerente ao estímulo antigênico. Além disto, após o protocolo vacinal (T<sub>3</sub>), estas diferenças tornaram-se menos acentuadas. Por outro lado, no período precoce pós desafio (T<sub>90</sub>) foi observado um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em culturas estimuladas com

SLcA nos grupos C, Sap, Sal e LBSal (Figuras 7-8, A/B). De forma interessante, no período tardio pós desafio ( $T_{885}$ ), este aumento foi observado em todos os grupos experimentais avaliados (C, Sap, LB, Sal, LBSal, LBSap e LBSapSal). Estes resultados parecem indicar que o desafio com *L. chagasi* aliado ao estímulo *in vitro* do SLcA favoreceria a produção de TNF- $\alpha$ , aparentemente de forma inespecífica entre os grupos avaliados (Figuras 7-8, A/B). Por outro lado, na presença do estímulo VSA apenas o grupo LBSapSal apresentou aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no período precoce ( $T_{90}$ ) e tardio pós desafio ( $T_{885}$ ), enquanto o grupo C este aumento foi significativo apenas no período tardio pós desafio ( $T_{885}$ ) (Figura 8A). De forma isolada, os resultados da avaliação de TNF- $\alpha$  não indicaram associação de eventos relacionados com resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. chagasi*. De fato, alguns estudos relacionam esta citocina a um perfil de resistência na LVC (Pinelli *et al.*, 1994; Carrilo *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009), ou ainda a susceptibilidade quando associado a elevados níveis de IL-4 e IL-10 (Panaro *et al.*, 2009), enquanto Lage *et al.* (2007) não observaram qualquer relação com resistência ou susceptibilidade na LVC. Desta forma, torna-se evidente com base nos resultados obtidos aliados aos trabalhos em LVC que outros estudos sejam conduzidos para que esta citocina possa ser considerada um biomarcador indicativo de resistência à infecção por *L. chagasi* em cães. As análises de correlação entre os níveis de TNF- $\alpha$  e o fenótipo de CMSP cultivadas *in vitro* evidenciaram no grupo LBSap correlação positiva entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> bem como com a expressão de MHC-II em linfócitos (Tabela 1). Este resultado parece associar a presença TNF- $\alpha$  com populações celulares importantes no controle da progressão da LVC (Reis *et al.*, 2009) ou como biomarcador de imunogenicidade (Reis *et al.*, 2010). Além disto, foram observadas correlações positivas nos grupos Sal e LBSal (TNF- $\alpha$  *versus* expressão de MHC-II em linfócitos; Tabela 2), Sap (TNF- $\alpha$  *versus* expressão de MHC-II em linfócitos; Tabela 1) e LB (TNF- $\alpha$  *versus* LT CD8<sup>+</sup>; Tabela 1). Embora estas correlações tenham sido observadas em biomarcadores atribuídos a resistência à infecção por *L. chagasi* (expressão de MHC-II em linfócitos e LT CD8<sup>+</sup>), isoladamente, estes resultados não permitem indicar que poderiam estar relacionados a uma resposta imune protetora.

Outra estratégia para avaliar a resposta imune nos diferentes grupos experimentais foi a análise dos níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de CMSP estimuladas *in vitro*. Neste sentido, foi observado redução dos níveis de NO no período precoce ( $T_{90}$ , estímulo

VSA) nos grupos C, LBSal e LBSapSal e no período tardio pós desafio ( $T_{885}$ , estímulo VSA ou SLcA) nos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal (Tabela 3). No entanto, apenas as culturas estimuladas com SLcA do grupo LBSapSal no período tardio pós desafio ( $T_{885}$ ) apresentaram aumento dos níveis de NO (Figura 14B). De maneira interessante, foram observadas correlações positivas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e NO nas culturas estimuladas com SLcA do grupo LBSapSal bem como no grupo LBSal (Tabela 3). Considerando que TNF- $\alpha$  atua induzindo a produção de NO, responsável pela morte de amastigotas no interior de macrófagos (Liew *et al.*, 1993), estes dados poderiam indicar o estabelecimento de um perfil associado a resistência induzido pela vacinação com LBSapSal. De forma semelhante, Araújo *et al.* (2009) também observaram aumento dos níveis de NO em CMSP de cães imunizados com a vacina Leishmune<sup>®</sup>, associando este resultado a um perfil de resistência. É importante ressaltar ainda que no grupo imunizado com LBSapSal foram observadas correlações positivas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup>, assim como entre os níveis desta citocina e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> (Tabela 2). Estes dados sugerem a possível contribuição de LT CD8<sup>+</sup> com a produção de TNF- $\alpha$ , bem como a participação desta citocina para induzir NO após imunização com a vacina LBSapSal. Esta possível participação de TNF- $\alpha$  na indução de NO também foi observada por Pinelli *et al.* (2000), onde a incubação de macrófagos caninos com sobrenadante de células T cultivadas com *Leishmania* contendo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 resultou em aumento na produção de NO e aumento da atividade leishmanicida de macrófagos.

De forma semelhante ao observado no período precoce ( $T_{90}$ ) nas culturas estimuladas com VSA dos grupos imunizados com LBSapSal e seus componentes isoladamente, foi observado também redução dos níveis de NO dos grupos Sap, LB e LBSap (Figura 13A). De forma interessante, embora tenha sido observada redução nos níveis de NO do grupo LB na presença de VSA e SLcA no período tardio ( $T_{885}$ ), a associação deste componente com o adjuvante saponina favoreceu a produção de NO do grupo LBSap (Figura 13A/B). A produção de NO tem se mostrado aumentada durante as imunizações com as vacinas LBSap e LBSapSal (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008a). Neste sentido, mesmo após o desafio experimental ( $T_{885}$ ) pode ser constatado níveis elevados de NO nos grupos LBSap e LBSapSal, que poderiam contribuir para a manutenção de um perfil imune relacionado a resistência frente a infecção experimental por *L. chagasi*.

De forma semelhante ao observado para a citocina TNF- $\alpha$ , a análise de IL-12 revelou aumento dos níveis desta citocina nas culturas estimuladas com SLcA, em  $T_0$ , sendo

significativo nos grupos Sap, LB, LBSal e LBSapSal (Figuras 9-10, A/B). Além disto, comparativamente as culturas estimuladas com VSA foi observado de forma geral um aumento dos níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA. Este resultado parece indicar que o estímulo antigênico proveniente de *L. chagasi* poderia induzir a produção de IL-12 por CMSP de cães, enquanto que na presença de antígenos de *L. braziliensis* não haveria qualquer estímulo para produção desta citocina, na ausência do protocolo vacinal (Figura 9-10, A/B). De forma interessante, este padrão de resposta foi mantido durante toda a avaliação, até o período tardio pós desafio (T885), com aumento dos níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA. No entanto, é importante ressaltar que o grupo LBSap foi o único a apresentar níveis significativamente superiores de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA, em comparação aos grupos Sap e LB, no período precoce pós desafio (T<sub>90</sub>) (Figura 9B). Por outro lado, a análise dos níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com VSA evidenciou um perfil distinto entre os grupos avaliados. Neste sentido, foi observado que após o término do protocolo vacinal (T<sub>3</sub>), apenas as culturas estimuladas com VSA dos grupos imunizados com LBSap e LBSapSal apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-12 (Figuras 9-10, A/B). Estes resultados permitem inferir que a imunização com as vacinas LBSap e LBSapSal são capazes de estimular níveis elevados de IL-12 na presença do antígeno vacinal, indicando a possibilidade de indução de mecanismos imunoprotetores neste período de avaliação (T<sub>3</sub>). Este perfil foi mantido no período tardio pós desafio (T<sub>885</sub>) nos grupos LB, Sal, LBSal, LBSap e LBSapSal. Resultados obtidos por Strauss-Ayali *et al.* (2005), mostraram que, após estimuladas com IL-12 exógeno, CMSP de cães infectados por *L. infantum* eram capazes de reverter um aparente estado de anergia, resultando em aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Menezes-Souza *et al.* (2011) verificaram que baixos níveis de IL-12 concomitante com altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  representam condição favorável para a persistência e replicação do parasito na pele. De fato, é possível especular que ao analisar em conjunto os baixo níveis de TGF- $\beta$  associado aos elevados níveis de IL-12 em avaliações pós desafio (T<sub>90</sub> e T<sub>885</sub>), estes dados poderiam representar o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores induzidos pelas vacinas LBSap e LBSapSal. Em concordância com esta hipótese, foram observadas, nas culturas estimuladas com VSA do grupo LBSap, correlações positivas entre os níveis de IL-12 e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> (Tabela 1) e, nas culturas estimuladas com SLcA deste mesmo grupo, correlações positivas entre os níveis de IL-12 e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos, sugerindo a presença simultânea de



biomarcadores importantes para o controle da infecção por *Leishmania* (Ravindran & Ali, 2004). Os níveis de IL-12 nas culturas estimuladas com SLcA foram negativamente correlacionados à frequência de LT CD4<sup>+</sup> nos grupos Sap, LB (Tabela 1), Sal e LBSapSal (Tabela 2). Estes resultados poderiam indicar que a população de LT CD4<sup>+</sup>, nestes grupos, não apresentaria importância para a produção de IL-12. Embora o papel de IL-12 na resistência à LVC ainda não esteja claro (Lage *et al.*, 2007; Alves, 2008; Alves *et al.*, 2009), os resultados obtidos neste trabalho sugerem o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores nos grupos vacinas (LBSap e LBSapSal). Esta hipótese é sustentada ao analisar os baixos níveis de TGF- $\beta$  associado aos elevados níveis de IL-12 que foram correlacionados aos elevados níveis de LT CD8<sup>+</sup>.

De forma semelhante ao observado para as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12, as análises dos níveis de IFN- $\gamma$  mostraram que antes da primeira dose vacinal (T<sub>0</sub>), o estímulo com SLcA induziu aumento dos níveis desta citocina em relação às culturas não estimuladas em todos os grupos experimentais, sendo significativo apenas nos grupos vacinais LBSap e LBSapSal (Figuras 11-12, B). Este resultado parece indicar que o SLcA é capaz de induzir também aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  em CMSP de cães. De forma interessante, após o término do protocolo vacinal (T<sub>3</sub>), os grupos imunizados com LBSap e LBSapSal apresentaram aumento bastante considerável dos níveis de IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com VSA ou SLcA, seja em comparação às culturas não estimuladas ou em relação às culturas estimuladas (VSA e SLcA) dos demais grupos (Figuras 11-12, A/B). Considerando que esta citocina tem sido associada a um perfil de resistência em diferentes modelos experimentais (Heinzel *et al.*, 1989; Squires *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009) os dados obtidos parecem indicar que após a imunização com as vacinas LBSap e LBSapSal ocorre uma forte indução da produção de IFN- $\gamma$  *Leishmania*-específica. Além disso, tanto no período precoce (T<sub>90</sub>) quanto no período tardio (T<sub>885</sub>) pós desafio, ambos os grupos vacinais (LBSap e LBSapSal) mantiveram os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  *Leishmania*-específico seja comparado as respectivas culturas controles ou as culturas estimuladas (VSA ou SLcA) dos demais grupos (Figuras 11-12, A/B). Estes dados, aliados à ocorrência de correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e os níveis de NO nos grupos vacinados com LBSap e LBSapSal (Tabela 3) parecem indicar uma forte imunogenicidade capaz de manter um padrão de resposta imune associado à resistência por longo período após o

desafio com o agente etiológico. Panaro *et al.* (2001) também observaram aumento da produção de NO e da atividade leishmanicida de macrófagos de cães imunizados com uma vacina composta por antígenos brutos de *L. infantum*, bem como aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de CMSP (Panaro *et al.*, 2001). De forma interessante, foram observadas correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> nos grupos LBSap e LBSapSal (Tabelas 1 e 2), além de correlações positivas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> no grupo LBSapSal (Tabela 2) ou expressão de MHC-II<sup>+</sup> em linfócitos nos grupos LBSap (Tabela 1) e LBSapSal (Tabela 2). Estes dados parecem indicar a presença simultânea de importantes biomarcadores associados a resistência na LVC (Reis *et al.*, 2009) ou de imunogenicidade e eficácia em vacinas contra LVC (Reis *et al.*, 2010), tais como IFN- $\gamma$ , NO, LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>, presentes nos grupos LBSap e LBSapSal. Araújo *et al.* (2008) e Araújo *et al.* (2009) observaram que o processo de vacinação com a Leishvacin ou com a Leishmune<sup>®</sup> induziu aumento do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, sendo que a subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> foi a principal fonte produtora desta citocina. De fato, no grupo vacinado com LBSapSal, houve correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  tanto com a frequência de LT CD4<sup>+</sup> como com a expressão de MHC-II<sup>+</sup> (Tabela 2). Correlações positivas também foram observadas no grupo LB entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD8<sup>+</sup> ou de LT CD4<sup>+</sup> (Tabela 2). De forma interessante, neste grupo também foi observada correlação positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e NO (Tabela 3). Estes dados podem ser um indicativo de que o antígeno empregado nas imunizações (LB) seja importante induzir um perfil de resistência, com a presença simultânea de IFN- $\gamma$ , NO, LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>. Já no grupo Sal, correlações positivas foram observadas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a expressão de MHC-II<sup>+</sup> (Tabela 2). Nas culturas estimuladas com SLcA deste grupo foram observadas correlações negativas entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a frequência de LT CD4<sup>+</sup> (Tabela 2). Estes resultados parecem indicar, de forma contrária ao observado no grupo LB, que os linfócitos T não estão presentes em associação com a produção de IFN- $\gamma$  no grupo inoculado apenas com saliva de *L. longipalpis* (Sal).

A avaliação parasitológica através de LDU não revelou a presença de parasitos em nenhum dos grupos experimentais. Possivelmente o baixo parasitismo aliado a baixa sensibilidade da técnica tenham favorecido para este resultado. Desta forma, para análise da carga parasitária torna-se necessária a análise por PCR em tempo real, atualmente em fase de padronização em nosso laboratório.

## **8. Conclusão**

O conjunto de dados obtidos neste trabalho indicam que as imunizações com as vacinas LBSap e LBSapSal são capazes de induzir um perfil de citocinas relacionado a resistência frente a infecção experimental por *L. chagasi*. Esta hipótese é sustentada pelos achados referente aos: (i) baixos níveis de TGF- $\beta$  no período pós desafio com *L. chagasi*, (ii) aumento dos níveis de IL-12 após o término do protocolo vacinal e pós desafio com *L. chagasi* (apenas para a vacina LBSap), (iii) aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  após o término do protocolo vacinal, mantido mesmo após o desafio com *L. chagasi* e (iv) aumento dos níveis de NO pós desafio com *L. chagasi*.

## **9. Perspectivas**

Os resultados obtidos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos relacionados aos eventos imunoprotetores após a vacinação com LBSap e LBSapSal seguido do desafio experimental com *L. chagasi*. Sendo assim, são propostas as seguintes perspectivas:

(i) Avaliar o padrão de citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$ ) em sobrenadante de cultura de células do baço e linfonodo estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (SLcA). Estas análises permitirão compreender melhor aspectos da resposta imune compartimentalizada de importantes órgãos linfóides;

(ii) Analisar a carga parasitária em medula óssea através de PCR em tempo real com o objetivo de aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico.

## **10. Bibliografia**

Abranches, P., G. Santos-Gomes, *et al.* An experimental model for canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol, v.13, n.5, Sep, p.537-50. 1991.

Aguiar-Soares, R. D. O. (2010). Imunogenicidade da vacina LBSapSal e Investigação Parasitológica/Molecular em Cães Após Desafio Intradérmico com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Extrato de Glândula Salivar de *Lutzomyia longipalpis*. (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 141p.

Alves, C. F. (2008). Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral. (Tese de doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 206p.

Alves, C. F., I. F. De Amorim, *et al.* Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.4, Apr 15, p.349-58. 2009.

Andrade, H. M., Toledo, V. P. C. P., Mayrink, W., Genaro, O. Evaluation of the Immune Response and Production of Interferon in Canine Visceral Leishmaniasis. Revue Med. Vet. n.50, 809-814. 1999.

Araujo, M. S. S. (2006). Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprofilaxia para leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 180p.

Araujo, M. S., R. A. De Andrade, *et al.* T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. Vaccine, v.27, n.7, Feb 11, p.1008-17. 2009.

Barbieri, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunol, v.28, n.7, Jul, p.329-37. 2006.

Barral, A., M. Barral-Netto, *et al.* Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.8, Apr 15, p.3442-6. 1993.

Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol, v.2, n.10, Oct, p.907-16. 2001.

Boggiatto, P. M., Ramer-Tait, A. E., Metz, K., Kramer, E. E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J. M., Gallup J. M., Jones, D. E., Petersen, A. C. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. Clinical and vaccine immunology, v.17, n.2, Feb, p.267-273.2010.



Bourdoiseau, G., C. Bonnefont, *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.56, n.3-4, May, p.345-51. 1997.

Brunda, M. J. Interleukin-12. J Leukoc Biol, v.55, n.2, Feb, p.280-8. 1994.

Carrillo, E., S. Ahmed, *et al.* Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. Vaccine, v.25, n.8, Feb 9, p.1534-43. 2007.

Chamizo, C., J. Moreno, *et al.* Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.103, n.1-2, Jan 10, p.67-75. 2005.

Coelho, E. A., C. A. Tavares, *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. Infect Immun, v.71, n.7, Jul, p.3988-94. 2003.

Correa, A. P., A. C. Dossi, *et al.* Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Vet Parasitol, v.143, n.3-4, Feb 28, p.267-74. 2007.

Coura-Vital, W., M. J. Marques, *et al.* Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. Vet J, May 17.

Da Costa-Val, A. P., R. R. Cavalcanti, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. Vet J, v.174, n.3, Nov, p.636-43. 2007.

Deane, L. M., M. P. Deane, *et al.* [Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara]. Rev Bras Malariol Doencas Trop, v.7, n.1, Jan, p.131-41. 1955.

De Lima, V. M., Ikeda, F. A., Rossi, C. N., Feitosa, M. M., Vasconcelos, R. O., Nunes, C. M., Goto, H. Diminished CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T cell and increased IFN- $\gamma$  levels occur in dogs vaccinated with Leishmune1 in an endemic area for visceral leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 135, Dec 30, p. 296-302. 2009.

Deplazes, P., N. C. Smith, *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol, v.17, n.9, Sep, p.451-8. 1995.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

Fernandes, A. P., M. M. Costa, *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine, v.26, n.46, Oct 29, p.5888-95. 2008.

Fujiwara, R. T., A. M. Vale, *et al.* Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. Vet Res, v.36, n.5-6, Sep-Dec, p.827-38. 2005.

Gantt, K. R., S. Schultz-Cherry, *et al.* Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. J Immunol, v.170, n.5, Mar 1, p.2613-20. 2003.

Genaro, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental (Tese de Doutorado em Parasitologia). Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 202 p, Doutorado em Parasitologia.

Genaro, O., de, T., V, da Costa, C. A., Hermeto, M. V., Afonso, L. C., & Mayrink, W.. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. Clin Dermatol, v.14, n.5, Sep-Oct, p.503-12. 1996.

Giunchetti, R. C., R. Correa-Oliveira, *et al.* A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. Vaccine, v.26, n.5, Jan 30, p.623-38. 2008a.

Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Vitoriano-Souza, J., Moreira, N. D., Malaquias, L. C., Castro, L. L. M., Lana, M., & Reis, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine, v.25, n.44, Nov 1, p.7674-86. 2007.

Giunchetti, (2007). Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Ciências). Ouro Preto: Instituto de Ciências Biológicas/Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 33-35p.

Giunchetti, R. C., O. A. Martins-Filho, *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.121, n.1-2, Jan 15, p.23-33. 2008b.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci, v.84, n.2, Apr, p.269-77. 2008c.

Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., & Reis, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J Comp Pathol, v.135, n.2-3, Aug-Oct, p.100-7. 2006.

Giunchetti, R. C., A. B. Reis, *et al.* Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. Res Vet Sci, v.85, n.1, Aug, p.106-12. 2008d.

Gradoni, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. Vet Parasitol, v.100, n.1-2, Sep 12, p.87-103. 2001.

Heinzel, F. P., M. D. Sadick, *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med, v.169, n.1, Jan 1, p.59-72. 1989.

Holaday, B. Role of CD8+ T Cells in Endogenous Interleukin-10 Secretion Associated with Visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.95, n.2, Mar/Apr, p.217-220. 2000.

Holzmuller, P., M. Cavaleyra, *et al.* Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. Vet Immunol Immunopathol, v.106, n.3-4, Jul 15, p.247-57. 2005.

Iniesta, L., M. Gallego, *et al.* Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.103, n.1-2, Jan 10, p.77-81. 2005.

Karp, C. L., S. H. El-Safi, *et al.* In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. J Clin Invest, v.91, n.4, Apr, p.1644-8. 1993.

Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., Engwerda, C. R., The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunological Reviews, v.201, p.239-253. 2004

Lage, R. S., G. C. Oliveira, *et al.* Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, v.115, n.1-2, Jan 15, p.135-45. 2007.

Laison, R., Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. 1987.

Leandro, C., G. M. Santos-Gomes, *et al.* Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.79, n.3-4, May 30, p.273-84. 2001.

Lemesre, J. L., P. Holzmuller, *et al.* Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. Vaccine, v.23, n.22, Apr 22, p.2825-40. 2005.

Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Goncalves, R. B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., & Papierok, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. Vaccine, v.25, n.21, May 22, p.4223-34. 2007.

Liew, F. Y. The role of nitric oxide in parasitic diseases. Ann Trop Med Parasitol, v.87, n.6, Dec, p.637-42. 1993.

Liew, F. Y. e C. A. O'donnell. Immunology of leishmaniasis. Adv Parasitol, v.32, p.161-259. 1993.

- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F., Gravino, A. E. Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), IL4 expression levels and Leishmania DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. Cytokine, n.44, p.288-292. 2008.
- Mayrink, W., C. M. Antunes, *et al.* Further trials of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.80, n.6, p.1001. 1986.
- Mayrink, W., O. Genaro, *et al.* Phase I and II open clinical trials of a vaccine against Leishmania chagasi infections in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.91, n.6, Nov-Dec, p.695-7. 1996.
- Mayrink, W., P. Williams, *et al.* An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brazil. Ann Trop Med Parasitol, v.79, n.3, Jun, p.259-69. 1985.
- Menezes-Souza, D., R. Correa-Oliveira, *et al.* Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. Vet Parasitol, Nov 19.
- Ministério da Saúde (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.
- Molina, D. N., J. L. Sanchez, *et al.* The spectrum of cutaneous lesions in pediatric patients with leukemia. P R Health Sci J, v.13, n.4, Dec, p.247-9. 1994.
- Moore, K. W., R. De Waal Malefyt, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol, v.19, p.683-765. 2001.
- Moreira, N. D., R. C. Giunchetti, *et al.* Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.4, Apr 15, p.418-24. 2009.
- Moreno, J., Alvar, J., (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol., 18, 399-405.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.
- Murray, H. W., K. E. Squires, *et al.* Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. J Immunol, v.148, n.6, Mar 15, p.1858-63. 1992.
- Noli, C. e S. T. Auxilia. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. Vet Dermatol, v.16, n.4, Aug, p.213-32. 2005.
- Nylen, S. e D. Sacks. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. Trends Immunol, v.28, n.9, Sep, p.378-84. 2007.

Omer, F. M., J. A. Kurtzhals, *et al.* Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? Parasitol Today, v.16, n.1, Jan, p.18-23. 2000.

Palatnik, C. B., R. Borojevic, *et al.* Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. Infect Immun, v.57, n.3, Mar, p.754-63. 1989.

Palatnik, C. B., J. O. Previato, *et al.* A new approach to the phylogeny of *Leishmania*: species specificity of glycoconjugate ligands for promastigote internalization into murine macrophages. Parasitol Res, v.76, n.4, p.289-93. 1990.

Palatnik-De-Sousa, C. B., W. R. Dos Santos, *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.65, n.5, Nov, p.510-7. 2001.

Palatnik-De-Sousa, C. B., H. S. Dutra, *et al.* *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML). Acta Trop, v.53, n.1, Mar, p.59-72. 1993.

Palatnik-De-Sousa, C. B., E. Paraguai-De-Souza, *et al.* Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). Braz J Med Biol Res, v.27, n.2, Feb, p.547-51. 1994a.

Palatnik-De-Sousa, C. B., Moreno, M. B., Paraguai-de-Souza, E., Borojevic, R. The FML vaccine (fucose-monose ligand) protects hamsters from experimental Kala-azar. Cienc. Cult (J. Braz. Assoc. Adv. Sci.), 46:290-296, 1994b.

Panaro, M. A., Acquafredda, A., Lisi, S., Lofrumento, D. D., Mitolo, V., Sisto, M., Fasanella, A., Trotta, T., Bertani, F., Consenti, B., & Brandonisio, O. (2001). Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 24, 187-195.

Panaro, M. A., Brandonisio, O., Cianciulli, A., Cavallo, P., Lacasella, V., Paradies, P., Testini, G., De Caprariis, D., Mitolo, V., Otranto, D. (2009). Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. Parasitology, v.136, Mar, p.823-831.

Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Mixed inflammatory regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol, n.146, p.124-32. 2006.

Pinelli, E., C. J. Boog, *et al.* A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. Tissue Antigens, v.43, n.3, Mar, p.189-92. 1994.

Pinelli, E., R. M. Gonzalo, *et al.* *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur J Immunol, v.25, n.6, Jun, p.1594-600. 1995.

Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun, v.62, n.1, Jan, p.229-35. 1994.

Pinelli, E., S. Y. Van Der Kaaij, *et al.* Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol, v.69, n.2-4, Aug 2, p.121-6. 1999.

Quinnell. R. J., Courtenay, O., Shaw, M. A., Day, M. J., Garcez, L. M., Dye, C., Kaye, P. M. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. J. Infect. Dis. 183, 1421-1424. 2001.

Quinnell, R. J., O. Courtenay, *et al.* IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.91, n.3-4, Feb 10, p.161-8. 2003.

Rafati, S., A. Nakhaee, *et al.* Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. Vaccine, v.23, n.28, May 25, p.3716-25. 2005.

Ravindran, R. e N. Ali. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. Curr Mol Med, v.4, n.6, Sep, p.697-709. 2004.

Reiner, S. L. e R. M. Locksley. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu Rev Immunol, v.13, p.151-77. 1995.

Reis, A. B. (2001). Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Reis, A. B., R. C. Giunchetti, *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. Trends Parasitol, v.26, n.7, Jul, p.341-9. 2010

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci, v.81, n.1, Aug, p.68-75. 2006a.

Reis A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Tafuri, W. L., Corrêa-Oliveira, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.1-3, Mar 15, p.87-95. 2009.

Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, *et al.* Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Clin Exp Immunol, v.146, n.2, Nov, p.303-11. 2006b.

Roatt, B. M. (2010). Imunogenicidade e Eficácia da Vacina LBSap em Cães Após Desafio Intradérmico com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e Extrato de Glândula Salivar de *Lutzomyia longipalpis*. (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 131p.

Rodrigues, V., Jr., J. Santana Da Silva, *et al.* Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, v.66, n.3, Mar, p.1233-6. 1998.

Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, *et al.* Vaccination with plasmid DNA encoding KPPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, v.25, n.46, Nov 14, p.7962-71. 2007.

Ruitenbergh, E.J., Solano-Gallego, L., Monen, J., Pinelli, E., Rutten, V.P.M.G. Immune responses in canine leishmaniasis. Summaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Greece, 32-36. 2001.

Santos, W. R., V. M. De Lima, *et al.* Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.21, n.1-2, Nov 22, p.30-43. 2002.

Santos-Gomes, G. M., R. Rosa, *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.88, n.1-2, Sep 6, p.21-30. 2002.

Schriefer, A., M. E. Wilson, *et al.* Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, v.21, n.5, Oct, p.483-8. 2008.

Sisto, M., O. Brandonisio, *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.24, n.4, Oct, p.247-54. 2001.

Skeiky, Y. A., M. Kennedy, *et al.* LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol*, v.161, n.11, Dec 1, p.6171-9. 1998.

Squires, K. E., R. D. Schreiber, *et al.* Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol*, v.143, n.12, Dec 15, p.4244-9. 1989.

Strauss-Ayali, D., G. Baneth, *et al.* Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol*, v.35, n.1, Jan, p.63-73. 2005.

Travi, B. L., Osorio, E. Y., Saldarriaga, O. A., Cadena, H., Tabares, C. J., Peniche, A., Lee, S., Melby, P. C. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.6, n.81, p.994-1003. 2009

Trinchieri, G., M. Rengaraju, *et al.* Producer cells of interleukin 12. Parasitol Today, v.9, n.3, Mar, p.97. 1993.

Vitoriano-Souza, J., A. B. Reis, *et al.* Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. Vaccine, v.26, n.31, Jul 23, p.3922-31. 2008.

Vodovotz, Y., C. Bogdan, *et al.* Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. J Exp Med, v.178, n.2, Aug 1, p.605-13. 1993.

Wahl, S. M. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. J Exp Med, v.180, n.5, Nov 1, p.1587-90. 1994.

Webb, J. R., A. Campos-Neto, *et al.* Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. Infect Immun, v.66, n.7, Jul, p.3279-89. 1998.

Webb, J. R., D. Kaufmann, *et al.* Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J Immunol, v.157, n.11, Dec 1, p.5034-41. 1996.

World Health Organization - WHO (2011). Leishmaniasis. Site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em 06/03/2011.

Zanin, F. H., E. A. Coelho, *et al.* Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. Microbes Infect, v.9, n.9, Jul, p.1070-7. 2007.