

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Laboratório de Imunopatologia - LIMP

“Ensaio clínico vacinal de Fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina”

RODRIGO DIAN DE OLIVEIRA AGUIAR SOARES

Ouro Preto – MG
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Laboratório de Imunopatologia - LIMP

RODRIGO DIAN DE OLIVEIRA AGUIAR SOARES

Ensaio clínico vacinal de Fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: *Dr. Alexandre Barbosa Reis* – Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto e Laboratório de Pesquisas Clínicas, Cipharma, Universidade Federal de Ouro Preto

Co-orientador: *Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti* – Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Ouro Preto – MG
2014

S676e Soares, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar
Ensaio clínico vacinal de fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune®, Leish-Tec®, KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina [manuscrito] / Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - 2014.
xviii, 139f.: il. color.; graf.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmaniose visceral - Teses. 2. Vacinas - Teses. 3. Cão como animal de laboratório - Teses. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.161:614.47

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br




Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:


“Ensaio clínico vacinal de Fase I e II para avaliação da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune®, Leish-Tec®, KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina”

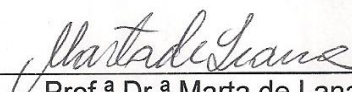
Aos quatro dias do mês de abril de 2014, às 14:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVA o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Patrícia S Tavares Veras
Examinadora (FIOCRUZ)


Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Examinador (UFPI)


Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
Examinador (FIOCRUZ)

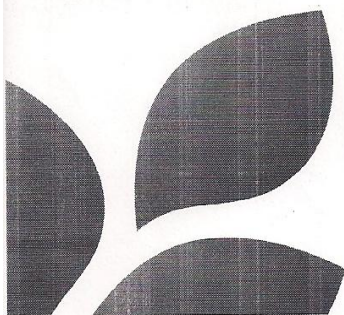

Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **04/04/2014**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol



Colaboradores

Dra. Cláudia Martins Carneiro¹

Prof. Nelder Figueiredo Gontijo²

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira³

Dr. Javier Moreno⁴

Dr. Bruno Mendes Roatt¹

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

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

3 – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

4 – Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III & Dpto. Biología Molecular – Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG (CBB-APQ-00356-10);

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa – CTBIOTECNOLOGIA/MCT/CNPq/CT-BIOTEC nº 21/2010 - Programa GENOPROT (560943/2010-5);

Capes/CNPq– Bolsa de Pós-Graduação Institucional de Assistência ao Ensino

Apoio e Instituições Parceiras

Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG)

Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP/MG

Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ/MG

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG/MG

Universidad Autónoma de Madrid, ISCIII/Madrid/Espanha

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazereres que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade".

Paulo Freire

Dedico esta tese,
Aos meus pais,
Ricardo Aguiar Soares e Lucimere de Oliveira,
e irmãos,
Rodolfo, Milli e Rudge

A Deus por me guiar em todos os caminhos e pela oportunidade de apredizado nesta vida;

Aos meus pais Ricardo Aguiar Soares e Lucimere de Oliveira Aguiar Soares pela direção e exemplos de perseverança e conduta. Por acreditarem em mim e depositarem seus esforços e investimentos em meu crescimento e formação. Pelo grande amor e cuidados que sempre tiveram por mim;

Aos meus avós Geraldo Soares (*in memoriam*) e Armênia Aguiar Soares (*in memoriam*), Tacredo Lopes (*in memoriam*) e Maria de Oliveira (*in memoriam*) pelo carinho e boas lembranças.

Aos meus irmãos Rodolfo Dian de Oliveira Aguiar Soares, Milli Dian de Oliveira Aguiar Soares e Rudge Dian de Oliveira Aguiar Soares que cada um, a seu modo, me dão alegria de vida; pela companhia e torcida. Mesmo não podendo ter escolhido, vocês são os melhores amigos que eu poderia ter.

À minha namorada Suelem Louzada Soares, pelo carinho e compreensão desta fase de minha vida, pelo companheirismo e confiança e por estar sempre ao meu lado apoiando-me em todas as decisões; TE AMO MUITO!

Ao meu orientador Alexandre Barbosa Reis, pela oportunidade que me foi dada na iniciação científica, 11 anos atrás, e por ter confiado em mim como aluno no mestrado e doutorado, e por compartilhar comigo seu grande conhecimento. Pela imensa contribuição na minha formação acadêmica e científica. Por ser um grande Mestre e amigo nesses anos. Muito obrigado por tudo, pelos vários conselhos e principalmente por me oferecer o privilégio de participar desde o início dos estudos em leishmaniose visceral canina na UFOP ao longo destes anos. Exemplo de dedicação e comprometimento com a academia e ciência;

Ao meu co-orientador Dr. Rodolfo Giunchetti, por estar sempre presente, cobrando quando necessário, meu sincero agradecimento pela contribuição nas etapas deste trabalho e por todo o apoio fornecido ao longo desta caminhada, que foram fundamentais no meu desenvolvimento científico e no amadurecimento dos resultados.

À Profa. Cláudia Martins Carneiro por todos os momentos de aprendizado, por toda a dedicação ao laboratório de Imunopatologia/NUPEB, pelo estímulo, conselhos e incentivo em minha jornada científica. Pela grande companhia ao longo destes vários anos.

A Arte & Manha, minha república em Ouro Preto que me acolheu e me ensinou muito nos anos da graduação. Por me compreenderem em todos os momentos e me incentivarem na caminhada acadêmica. Muito obrigado a cada um: alunos, amigos e ex alunos;

Aos amigos de Ponte Nova: Dio, Maicon, Balu, João, Francis, Marla, que mesmo distantes, torceram sempre por mim, os tenho guardados comigo.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB que contribuíram de forma essencial no desenvolvimento da pesquisa, na manutenção da colônia de cães destinados à experimentação e realização dos diferentes experimentos. Seguramente toda a dedicação e trabalho desempenhados por vocês foram de grande valia na obtenção dos diferentes resultados gerados no laboratório. Em especial, Lilliane, João, Tharik, André, Marcelo, Mariana L., Mariana T., Daiane, Narjara, Diogo.

E aos amigos e companheiros de pós-graduação, Samuel L. Braga, Micheline, Lucilene, Amanda, Carol, Luiza, Flávia, Kátia obrigado pela amizade e excelente convivência.

Ao Henrique G. Ker e Sheler Martins pela convivência e amizade nestes últimos anos, e pela motivação dia a dia para realização e conclusão desta tese. Não posso esquecer os churrascos no Morro e das coças do Flusão no Vasquinho.

As grandes amizades geradas ao longo destes 11 anos de ciência, em especial ao Wendel, Nádia, Juliana, Fernando, Jamille, Levi, Gleise, Rory pelos grandes momentos compartilhados, e pelo auxílio nas técnicas e metodologias desenvolvidas durante a tese, como pelo crescimento e aprendizado conjunto.

Ao meu grande amigo Bruno Mendes Roatt, companheiro de DOTA, mas acima de tudo o irmão de todo dia, que sei que sempre posso contar, até nos momentos mais inesperados e difíceis, que muito me auxiliou ao longo de toda nossa formação científica.

À Maria Chaves dos Santos e a Tânia funcionárias do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB, por colaborar na conservação da ordem diária, contribuindo para o bom funcionamento diante das diversas atividades desempenhadas no nosso laboratório.

À Profa. Marta de Lana pelo seu exemplo de dedicação, ética e inteligência, desde a minha graduação até na minha formação científica.

Ao Laboratório de Doença de Chagas, representados pela Profa. Terezinha Bahia, Prof. André Talvani, Girley, Jaqueline, Vitor, Renata e demais pela agradável convivência.

Aos Professores Evandro, a Professora Paula e a Professora Vanja pela convivência e aprendizado de cada dia.

Às secretários dedicados do programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, pela prontidão na resolução dos tramites burocráticos e pela grande simpatia em sempre nos atender.

Ao “Biotério” (CCA-UFOP) e todos os seus funcionários: por todo esforço e trabalho na manutenção e cuidado dos animais de experimentação.

Ao Prof. Luís Carlos Crocco Afonso, coordenador da pós-graduação, que através do programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB concedeu oportunidade de realização desse trabalho;

.

À Pró-Reitoria de Pesquisa de Pós-Graduação da UFOP em nome do Prof. Tanus Jorge Nagem e do Prof. André Barros Cota, pelo apoio à nossa linha de pesquisa.

Agradecimento especial aos amados cães deste experimento, a cada um deles minha gratidão, por nos fazer rir no dia a dia do canil.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 - Aspectos gerais das Leishmanioses	6
2.2 - Biomarcadores de imunogenicidade e eficácia vacinal na leishmaniose visceral canina	10
2.3 - Vacinologia na leishmaniose visceral canina	17
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	30
4.1 – Objetivo Geral	32
4. 2 – Objetivos Específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 - Obtenção da colônia de cães para os ensaios de Fase I e II no canil fechado da UFOP	34
5.2 - Desenho experimental	34
A) Produção dos antígenos vacinais e preparo do adjuvante saponina	34
B) Grupos experimentais	35
C) Delineamento experimental e abordagens investigativas	36
D) Infecção/Desafio Experimental.....	39
E) Obtenção de amostras de sangue periférico	40
5.3 - Metodologias aplicadas à análise de inocuidade e toxicidade vacinal	40
A) Avaliações comportamentais, fisiológicas e clínicas	40
B) Análise do perfil hematológico (Eritrograma e Leucograma)	41
C) Análise do perfil bioquímico em soro	41
5.4 - Metodologias aplicadas à análise da imunogenicidade vacinal	41
A) Ensaio de imunofenotipagem celular - <i>ex vivo</i>	41
B) Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo - <i>ex vivo</i>	43
C) Obtenção do antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> (ASLi) para os ensaios <i>in vitro</i>	47
D) Ensaio <i>in vitro</i> de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas	47
E) Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo	49

F) Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios <i>in vitro</i> de linfoproliferação e imunofenotipagem	50
G) Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem.....	51
H) Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e imunofenotipagem das CMSP pós-cultivo	53
I) Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> : teste imunocromatográfico rápido (RT DPP [®] – Bio-Manguinhos [®]) e ensaio imunoenzimático (EIE [®] – Bio-Manguinhos [®])	55
5.5 - Metodologias aplicadas à análise da potência vacinal	55
A) Punções aspirativas de medula óssea e isolamento do parasito de <i>Leishmania</i>	55
B) Análise Molecular para quantificação da carga parasitária na medula óssea pela técnica de PCR em tempo real.....	56
B1 – Extração massa de promastigotas	56
B.2 - Extração do DNA das amostras de medula óssea	57
B.3 - Construção da curva padrão para a PCR em tempo real.....	58
5.6 - Análise Estatística	60
6. RESULTADOS	62
6.1 - Inocuidade e Toxicidade vacinal.....	63
A) Acompanhamento clínico de cães controle e submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais.....	63
B) Alterações fisiológicas: Medidas de temperatura retal (°C) e peso corporal (Kg)...	64
C) Avaliação do perfil hematológico de cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais antes e após o desafio experimental	65
D) Avaliação do quadro bioquímico de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental.	69
D.1 - Provas de função renal.....	69
D.2 - Provas de função hepática	72
D.3 - Proteinograma	75
6.2 - Imunogenicidade vacinal: resposta imune celular em ensaios <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> ..	74
A) Avaliação <i>ex vivo</i> da resposta imune.....	74
A.1 - Perfil fenotípico de linfócitos T (CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺) circulantes do sangue periférico.....	74

A.2 - Perfil fenotípico de linfócitos B, células NK (CD5 ⁻ CD16 ⁺) e monócitos (CD14 ⁺) circulantes do sangue periférico.....	76
B) Avaliações <i>in vitro</i> da Resposta Imune	78
B.1 - Atividade linfoproliferativa e perfil imunofenotípico de subpopulações de linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) submetidos à estimulação antigênica com antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i>	78
B.2 - Produção intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 em Linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) após estimulação com antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>	80
C) Reatividade de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães imunizados com diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental, através do teste imunocromatográfico rápido (TR DPP [®] – Bio-Manguinhos [®]) e ensaio imunoenzimático (EIE [®] – Bio-Manguinhos [®])	82
6.3- Potência vacinal:	84
A) Avaliação dos sinais clínicos sugestivos de LVC após o desafio experimental	84
B) Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea.....	85
B.1- Isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT (Mielocultura).....	85
B.2 – Avaliação da carga parasitária na medula óssea através da PCR em tempo real ...	86
7. DISCUSSÃO	88
8. CONCLUSÃO.....	116
9. PERSPECTIVAS	118
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
11. ANEXOS.....	137

ALT	Alaninaminotransferase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AST	Aspartatoaminotransferase
ASLi	Antígeno Solúvel de <i>L. infantum</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCA	Centro de Ciência Animal
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Tamanho)
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Linfócitos B
LIT	<i>Liver infusion tryptose medium</i>
LT	Linfócitos T
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MPL	Monofosforil lipídeo A
NaCl	Cloreto de sódio

NK	<i>Natural Killer</i>
NNN	Nicole, Novy & Neal (Meio de cultivo bifásico)
NO	Óxido Nítrico
NUPEB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina)</i>
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA _m	RNA Mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SSC	<i>Side Scatter</i> (Complexidade/Granulosidade)
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
RT DPP [®]	<i>Rapid test Dual Path Platform</i>
TNF- α ,	Fator de necrose tumoral- α
Tris	Tris (Hidroximetil aminometano)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	<i>World Health Organization</i> (OMS)
μ m	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro

Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais e submetidos a infecção/desafio experimental com *L.infantum*: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem Kinetoplastida de 11 kDa, de *Leishmania infantum*); T0 = Antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 180 dias após a infecção experimental.....**38**

Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de Linfócitos T CD3⁺ e Linfócitos B no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ (B: CD3⁺/FL1 versus FL4) e percentual das populações de linfócitos B (C: Células B/FL2 versus FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas freqüências (%) correspondentes a cada quadrante.....**44**

Figura 2: Sequência da análise realizada para quantificar o percentual de Linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ (B: CD3⁺/FL1 versus CD4⁺/FL2) e percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ (C: CD3⁺/FL1 versus CD8⁺/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas freqüências (%) correspondentes a cada quadrante.....**45**

Figura 3: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de células NK CD5-CD16⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de células NK CD5-CD16⁺ (B: CD5⁺/FL2 versus CD16⁺/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas freqüências (%) correspondentes a cada quadrante.....**46**

Figura 4: Sequência da análise realizada para quantificar o percentual de monócitos CD14⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R2, indicando o posicionamento da população de monócitos, bem como para quantificação do percentual total de monócitos.....**46**

Figura 5: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ e T CD4⁺IFN- γ ⁺ na cultura de sangue total em cães submetidos diferentes protocolos vacinais. (A) Gráficos de distribuição pontual de CD4⁺/FL1 versus

SSC para a seleção da população celular de interesse – R3 com o fenótipo CD4^{High} SSC^{low}. (B) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL1 versus IL-4/FL2 contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ (R4) em cultura estimulada com ASLi (C) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4/FL1 versus IFN- γ /FL2, contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ (R5) em cultura estimulada com ASLi. Acima dos balões/regiões demarcadas em B (R4) e C (R5) estão demonstrados as frequências (%) correspondentes a cada região (R4) e (R5) dos gráficos bidimensionais de fluorescência.....50

Figura 6: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4⁺ (C e D) na cultura de CMSP de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfoproliferação em cultura estimulada com ASLi. (C) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ totais (proliferados e não proliferados) (R3) em cultura estimulada com ASLi. (D) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ proliferados (R4) em cultura estimulada com ASLi.....54

Figura 7: Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania* spp. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos (10⁶ a 10⁰) e em Y os valores de Ct correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do slope (-3,32), coeficiente de linearidade (R² =0,999) e a eficiência (100%).....60

Figura 8: Perfil imunofenotípico de linfócitos circulantes em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a terceira dose vacinal; T2 = seis meses após o desafio experimental. O eixo y representa o número médio de linfócitos T (LT) CD3⁺ (A), CD3⁺CD4⁺ (B) e CD3⁺CD8⁺ (C). As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente.....75

Figura 9: Perfil imunofenotípico de linfócitos B, Monócitos e Células NK circulantes em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a primeira dose vacinal; T2 = 15 dias após a segunda dose vacinal; T3 = 15 dias após a terceira dose vacinal. O eixo y representa o número médio de Células NK CD5⁻CD16⁺ (A), linfócitos B (B) e Monócitos CD14⁺ (C). As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente.....77

Figura 10: Índice médio de proliferação e desvio padrão de CMSP em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após estímulo *in vitro*. O eixo x ilustra em T1 (15 dias após terceira dose vacinal) e T2 (seis meses após o desafio experimental) os diferentes grupos vacinais: C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11. O eixo y representa os valores

médios e desvio padrão do índice de proliferação (razão da média de linfócitos proliferados das culturas estimuladas com ASLi (Ag) pelas culturas controles não estimuladas (C)). (A) linfoproliferação total; (B e C) Proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos estão representadas por linhas conectivas. As diferenças significativas ($p < 0,05$) do mesmo grupo entre os tempos T1 e T2 estão representados pelo (*).79

Figura 11: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após estímulo *in vitro*. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a terceira dose vacinal; T2 = seis meses após o desafio experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 calculados através da razão entre culturas estimuladas com ASLi e culturas controle não estimuladas (Ag/C). (A) linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4, (B) linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , (C) linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4, (D) linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ . As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos estão representadas por linhas conectivas. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados dentro de um mesmo grupo estão representados por T0, T1 e T2.81

Figura 12: Reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* em soros de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes (T1) e após o desafio com *L. infantum* (T2). O eixo x ilustra os tempos de avaliação: T1(quinze dias após as três doses vacinais) e T2 (seis meses após o desafio experimental). O eixo y representa os valores médios da densidade óptica dos grupos pelo teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) utilizando-se soros [*cut-off* = 0,164]. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, relacionadas aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 respectivamente.83

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.	42
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> .	49
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular no contexto <i>in vitro</i> em CMSP cultivadas por 5 dias.	53
Tabela 4: Avaliação da Inocuidade e Toxicidade em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais	65
Tabela 5: Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental	67
Tabela 6: Eritrograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental	68
Tabela 7: Análises bioquímicas da função renal de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental	70
Tabela 8: Análises bioquímicas da função hepática de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental .	71
Tabela 9: Análises bioquímicas do proteinograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental	73
Tabela 10: Avaliações sorológicas de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental.	84
Tabela 11: Avaliação Clínica em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio experimental com <i>L.infantum</i>	85
Tabela 12: Avaliações parasitológicas em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais seis meses após o desafio experimental	86

Resumo

O presente estudo avaliou a toxicidade/inocuidade, imunogenicidade e eficácia/potência dos protótipos vacinas KMP-11 e LBSap, de forma comparativa com as vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®], em um ensaio clínico vacinal de fase I e II. Para isso, trinta e cinco cães foram classificados em cinco grupos (sete cães por grupo): i) grupo controle receberam 1 mL de solução salina estéril 0,9%; ii) grupo Leish-Tec receberam a vacina comercial Leish-Tec[®]; iii) Grupo Leishmune receberam a vacina comercial Leishmune[®]; (iv) grupo LBSap recebeu 600 µg de proteína de promastigotas de *L. braziliensis* e 1 mg do adjuvante saponina; (v) grupo KMP-11 receberam 100 µg do antígeno recombinante KMP-11 associado a 1 mg do adjuvante saponina. Uma análise detalhada e comparativa da inocuidade/toxicidade vacinal foi realizada através do quadro clínico, bioquímico e hematológico entre as doses de imunização e após o término das três doses vacinais. Embora em alguns cães dos grupos KMP-11, LBSap e Leishmune tenham apresentado alterações no local dos inóculos vacinais, relacionados ao adjuvante saponina, como: nódulos, edema leve, dor local, estes foram transientes e desapareceram após setenta duas horas da vacinação. Nossos resultados de inocuidade indicam que as alterações adversas provocadas pelas imunizações são toleráveis, tendo em vista a importância e funcionalidade que uma vacina canina eficaz promoveria no controle da doença. Nossos resultados da imunogenicidade vacinal demonstram um aumento da população circulante de linfócitos T CD8⁺ ao final do protocolo vacinal (T1) nos grupos LBSap e Leish-Tec, além de seis meses após o desafio experimental (T2) no grupo LBSap. Também foi observado em T1 aumento de linfócitos B (grupo Leishmune) e de monócitos CD14⁺ (grupos LBSap, Leishmune e KMP-11), que justificam e reforçam o potencial imunoproliferativo destas vacinas. Nas análises *in vitro* foi observado aumento na atividade linfoproliferativa nos grupos LBSap e Leishmune, sendo no grupo LBSap um aumento antígeno-específico de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺. Uma segunda abordagem das análises *in vitro* buscou avaliar o percentual de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-γ e IL-4, onde foi observado no grupo LBSap aumento de ambas as subpopulações produtoras de IFN-γ, sendo também evidenciado um aumento de T CD8⁺ produtores de IFN-γ no grupo Leish-Tec. Nossos resultados de imunogenicidade reforçam a hipótese que o processo vacinal, principalmente, com a vacina LBSap levam a geração de uma resposta imune protetora contra o agente etiológico da LVC compatível com o controle do parasito de *L. infantum*. Nossos resultados da reatividade sorológicos demonstraram que o TR DPP[®] foi capaz de distinguir os cães doentes dos vacinados. Após o desafio experimental pela via endovenosa os cães foram acompanhados por 6 meses e foram evidenciadas alterações clínicas sugestivas da infecção por *Leishmania*, entretanto, na maioria dos cães foi observado uma infecção assintomática. Na avaliação parasitológica da medula óssea foi possível isolar o parasito (mielocultura) bem como quantificar o DNA (qPCR) de *Leishmania* em todos os grupos, sendo observado redução considerável da carga parasitária da medula óssea em todas as vacinas testadas em relação ao grupo Controle. Entretanto, no grupo de cães imunizados com LBSap esta redução foi mais evidente, chegando a ser 47 vezes menor. Com base no que foi exposto, a vacina LBSap seria a mais indicada para prosseguimento em ensaio clínico vacinal de fase III, em relação a vacina KMP-11.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, vacinas, LBSap, Leishmune, Leish-Tec, KMP-11, *Leishmania infantum*, cão.

Abstract

This study evaluated the toxicity/safety, immunogenicity and efficacy/potency of vaccines prototypes KMP-11 and LBSap, in comparison to the commercial vaccines Leishmune[®] and Leish-Tec[®], in a vaccine clinical trial phase I and II. For this, thirty-five dogs were classified into five groups (seven dogs per group): i) control group received 1 mL of sterile 0.9% saline solution; ii) Leish-Tec group received the Leish-Tec[®] commercial vaccine; iii) Leishmune group received the Leishmune[®] commercial vaccine; (iv) LBSap groups received 600 µg of *L. braziliensis* promastigotes protein and 1 mg of saponin adjuvant; (v) KMP-11 group (n=7) received 100 µg recombinant KMP-11 antigen associated to 1 mg saponin adjuvant. A detailed and comparative analysis of safety/toxicity vaccination was performed by clinical, biochemical and hematological parameters between dose and immunization after the end of the three vaccine doses. Although some groups of dogs KMP-11, LBSap and Leishmune have presented changes at the site of vaccination inoculum, related to saponin adjuvant, such as nodules, mild edema, and local pain, these were transient and disappeared seventy two hours after vaccination. Our results indicate that the safety of adverse changes caused by immunizations is tolerable in view of the effective canine vaccine importance and functionality that it promotes in the disease control. Our results of the immunogenicity vaccine demonstrate increase in circulating population of T CD8⁺ lymphocytes in the end of the immunization protocol (T1) in groups LBSap and Leish-Tec, as long as six months after experimental challenge (T2) in LBSap group. It was also observed in T1, an increase of B lymphocytes (Leishmune group) and monocytes CD14⁺ (LBSap, Leishmune and KMP-11 groups), that justify and reinforce the potential immunoprophylactic of these vaccines. In the *in vitro* analyzes an increase in lymphoproliferative activity in groups LBSap and Leishmune was observed, occurring in LBSap group an antigen-specific increase of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. A second approach of *in vitro* assays aimed to evaluating the percentage of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes producers of IFN-γ e IL-4, where an increase in both IFN-γ producing subpopulations in the group LBSap was observed, and it also showed an increase in IFN-γ producers in CD8⁺ lymphocytes in the Leish-Tec group. Our immunogenicity results support the hypothesis of the vaccine process, especially with the LBSap vaccine generating a protective immune response against the causative agent of CVL compatible with *L. infantum* parasite control. Our results of serological reactivity demonstrate that TR DPP[®] was able to distinguish among diseased and vaccinated dogs. After experimental challenge by intravenous route the dogs were followed for 6 months and clinical changes suggestive of *Leishmania* infection were observed, however in the majority of dogs asymptomatic infection was observed. In the parasitological evaluation of bone marrow it was possible to isolate the parasite (myeloculture) and quantify the DNA (qPCR) of *Leishmania* in all groups, significant reduction in parasite burden in the bone marrow was observed in all vaccines tested compared to control group. However, in the group of dogs immunized with LBSap this reduction was more evident, being 47 times smaller. Based on the foregoing, the LBSap vaccine would be the most suitable for further research in phase III clinical trial vaccine in relation to KMP-11 vaccine.

Keywords: Visceral leishmaniasis, vaccines, LBSap, Leishmune, Leish-Tec, KMP-11, *Leishmania infantum*, dog.

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é endêmica em 88 países, sendo 67 no Velho Mundo e 21 no Novo Mundo, porém, aproximadamente 90% dos casos notificados concentram-se na Índia, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh, Etiópia e no Brasil (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2005). Esta ampla distribuição geográfica posiciona a LV como uma das mais importantes doenças negligenciadas emergentes, com elevada prevalência nos países da América Latina (Tesh, 1995). No Brasil, observa-se que 20 das 27 unidades federativas registraram transmissão autóctone, atingindo as cinco regiões brasileiras, com maior número de casos na região Nordeste. Apesar disso, ao se analisar a série histórica observa-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de casos confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008 (MS/2010). Por outro lado, a doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (MS/2010).

Na tentativa de se estabelecer medidas de controle da LV a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza como prática profilática o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida com efeito residual em domicílio e peridomicílio, além da eutanásia do reservatório urbano do parasito, o cão (WHO, 2005; MS/Brasil, 2006). Entretanto, a eutanásia de cães soropositivos muitas vezes sem qualquer sinal clínico da infecção, torna-se cada vez mais questionável e insustentável (Desjeux, 2004). Este fato está relacionado à indignação e resistência dos proprietários de animais com leishmaniose visceral canina (LVC) em aceitar esta medida, considerando o papel que o cão representa na sociedade atual como animal de companhia ou guarda. Infelizmente até o momento não há qualquer esquema terapêutico eficaz na promoção da cura parasitológica dos animais com LVC, de forma a impedir a transmissão do parasito a flebotomíneos. Além disto, o tratamento da LVC pode possibilitar a seleção de cepas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano e por isto o emprego da terapêutica anti-LVC tem sido contra indicada ou proibida quando se trata da utilização de antimoniais pentavalentes ou de outras drogas leishmanicidas (MS/Brasil, 2006). Neste sentido, considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz (Neogy *et al.*, 1994, Moreno *et al.*, 1999, Rhalem *et al.*, 1999, Baneth & Shaw, 2002, Nieto *et al.*, 2003, Noli & Auxilia, 2005, Saridomichelakis *et al.*, 2005, Pasa *et al.*, 2005, Vouldoukis *et al.*, 2006) e que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, e que há possibilidade de surgimento de novas epidemias, a imunoprofilaxia apresenta-se como principal alternativa a ser incluída nos programas de

controle da LV. Vacinas contra LVC podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a infecção canina e impedir a infecção humana, levando a OMS a estimular o desenvolvimento de pesquisas que busquem potenciais vacinas contra LVC (O'Hagan & Valiante, 2003; WHO, 2010; Reis et al., 2010).

Assim, são de fundamental importância os investimentos científicos e biotecnológicos com ênfase no desenvolvimento de vacinas que possam ser aplicadas em programas governamentais de controle da LV. Nosso grupo de pesquisa tem investido nos últimos anos grandes esforços para criação e estabelecimento do centro de referência em testes de drogas e vacinas para leishmanioses. Este centro atualmente conta com uma grande infra-estrutura interdisciplinar, interdepartamental (NUPEB, CIPHARMA/EF) e interinstitucional (FIOCRUZ/MG e UFMG), testando nos últimos anos diferentes protótipos de vacinas anti-LVC em ensaios de Fase I e II.

Neste sentido, recentemente foi proposto o estudo de dois novos imunobiológicos compostos por antígenos brutos de promastigotas de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina (LBSap) e/ou saliva de *Lutzomyia longipalpis* (LBSapSal) (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti et al., 2008c; Roatt et al., 2012; Aguiar-Soares et al., 2014). A vacina LBSap tem demonstrado forte imunogenicidade, tanto no âmbito da resposta celular quanto humoral, indicando o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção pelo agente etiológico da LVC. Considerando estes resultados promissores de imunogenicidade da vacina LBSap e a necessidade de se compreender melhor a resposta imune e aspectos parasitológicos, após o desafio experimental com *L. infantum* pela via endovenosa, propomos no presente estudo ampliar as avaliações de Fase I e II em cães imunizados com a vacina LBSap (Giunchetti et al., 2008c; Roatt et al., 2012), empregando-se uma análise detalhada da inocuidade e imunogenicidade após as três doses vacinais bem como um acompanhamento longitudinal de seis meses após o desafio/infecção experimental endovenosa com *L. infantum*. Além disso, foi testado paralelamente o potencial vacinal em cães do antígeno recombinante da proteína de membrana da ordem Kinetoplastida de 11 kDa (KMP-11) que vem sendo amplamente estudado e proposto como componente antigênico vacinal em diferentes modelos experimentais (Carrilo et al., 2008; Bhaumik et al., 2009; da Silva et al., 2011). Estes dois protótipos vacinais foram submetidos a avaliações de inocuidade/toxicidade, imunogenicidade e potência neste ensaio clínico vacinal de fase I e II proposto pelo trabalho, paralelamente, e em

comparação com as duas vacinas contra LVC licenciadas e disponíveis comercialmente nas clínicas veterinárias para uso em cães (Leishmune[®] e Leish-Tec[®]).

2. Revisão da Literatura

2.1 - Aspectos gerais das Leishmanioses

O gênero *Leishmania* descrito em 1903 por Ross compreende protozoários digenéticos da Ordem Kinetoplastida, Família *Trypanosomatidae*, que apresentam formas promastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado e formas amastigotas, que parasitam células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado (Kaye & Scott, 2011). A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo conhecidos dois gêneros: *Lutzomyia*, presente no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Lainson & Shaw, 1987). No Brasil, são encontradas inúmeras espécies de flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora da *Leishmania (Leishmania) infantum* (Lainson & Shaw, 1978).

Atualmente, existem 12 a 14 milhões de pessoas infectadas no mundo, estimativas indicam que cerca de 350 a 400 milhões encontram-se em áreas de risco, 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (Ashford *et al.*, 2000; WHO, 2010). As leishmanioses apresentam amplo espectro clínico podendo variar desde uma lesão cutânea localizada, com cura espontânea, até uma doença sistêmica generalizada com elevado grau de morbidade e mortalidade. As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dependem de vários fatores como: espécie de *Leishmania* envolvida e sua virulência e aspectos relacionados à condição nutricional e imunológica do hospedeiro. A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em quatro principais formas clínicas: (i) leishmaniose cutânea localizada, (ii) leishmaniose cutâneo mucosa, (iii) leishmaniose cutânea difusa e (iv) leishmaniose visceral (LV), sendo que no Novo Mundo as três primeiras formas são agrupadas em uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA). É importante ressaltar que a LV é a mais letal entre as manifestações clínicas das leishmanioses; estimam-se 500.000 novos casos da doença e 59.000 mortes todos os anos (Desjeux, 2004; WHO 2010) e assim como na LTA a LV pode ser agrupada em quatro formas clínicas (Assintomática ou Inaparente, Oligossintomática ou Subclínica, Sintomática Aguda e Crônica ou Calazar propriamente dito) (Badaró *et al.*, 1986a; Badaro 1986b; D'Oliveira *et al.*, 1997).

Do ponto de vista epidemiológico, a LV apresenta ampla distribuição podendo ocorrer em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Deane & Deane, 1962; Alvar *et al.*, 2004). A incidência de leishmaniose visceral humana é de meio milhão ao

ano (Ashford *et al.*, 1992; WHO, 1995; WHO, 2010). Endêmica em 88 países, sendo 67 no velho mundo e 21 no novo mundo, porém, aproximadamente 90% dos casos notificados concentram-se na Índia, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh, Etiópia e no Brasil (WHO, 2010; Alvar *et al.*, 2012). Esta ampla distribuição posiciona a LV como uma das mais importantes doenças emergentes, com elevada prevalência nos países da America Latina (Tesh, 1995), desde o sul do México até o norte da Argentina sendo o Brasil responsável por 90% dos casos ocorridos no continente americano (Arias *et al.*, 1996; Desjeux, 2004; Gould *et al.*, 2013). É importante ressaltar que estes dados são subestimados, devido às limitações inerentes ao sistema de notificação de cada país onde esta enfermidade ocorre (Desjeux, 2004; WHO, 2010; Alvar *et al.*, 2012). Estes números representam aproximações, pois a notificação é compulsória em somente 32 dos países endêmicos, dos 88 existentes, e mesmo nestes acredita-se que considerável proporção de casos não sejam notificados (Collin *et al.*, 2006; Maia-Elkhoury *et al.*, 2007; Alvar *et al.*, 2012). No Brasil, observa-se que 20 das 27 unidades federativas registraram casos da doença, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, atingindo as cinco regiões brasileiras, com maior número de casos na região Nordeste, entretanto, ao se analisar a série histórica observa-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de casos confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008 (MS/Brasil, 2010). Por outro lado, a doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (MS/Brasil, 2010; Dantas-Torres, 2005; Souza *et al.*, 2012; Brazuna *et al.*, 2012; Barata *et al.*, 2013). Anualmente, no Brasil são reportados aproximadamente 3.500 casos de LV, destes cerca de 10% evoluem ao óbito (Dantas-Torres, 2005). Apesar de ser menos conhecida ou reconhecida, recentemente se tornou público que a LV fez mais óbitos que a Dengue na última década (2001-2011) em nove Estados do Brasil sendo Minas Gerais o estado com maior número de casos (SINAN, 2012).

No Brasil, Deane (1956) e Deane (1961), forneceram grande contribuição para o entendimento de aspectos relacionados à epidemiologia da *L. infantum*, em que ficou documentada a participação do cão como reservatório doméstico, e da raposa (*Dusicyon vetulus*), como reservatório silvestre do parasito. Desta forma, desde a década de 50 foi estabelecido que o cão é um importante elo no ciclo de transmissão da LV. Além disto, do ponto de vista epidemiológico a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) atualmente é

considerada mais importante que a doença humana em função de sua alta prevalência e pelo fato de que uma parcela dos cães infectados apresentarem intenso parasitismo cutâneo, fundamental para manter o ciclo de infecção pelo inseto vetor (Molina *et al.*, 1994, Giunchetti *et al.*, 2006, Michalsky *et al.*, 2007). A importância dos cães como fonte de infecção de *L. infantum* fica ainda mais evidente quando se observa que a maioria dos focos de LV humana no Brasil é precedida de casos caninos e estão intimamente relacionadas às áreas onde se encontram altos índices de soroprevalência canina (Molina *et al.*, 1994; Palatnick-de-Souza *et al.*, 2001; Fraga *et al.*, 2012; Coura-Vital *et al.*, 2013).

Apesar das leishmanioses serem consideradas tipicamente rurais, e os princípios fundamentais da epidemiologia da LV, bem como as medidas de controle sejam bem conhecidos, tem se observado uma crescente urbanização do Calazar em diferentes regiões do mundo (Ashford, 2000, Desjeux, 2004). Estes fatos, naturalmente dificultam a manutenção das medidas de controle sendo que hoje o Brasil é o único país do mundo que pratica a eutanásia de cães soropositivos. No Brasil, dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam crescente periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro-RJ, Belo Horizonte-MG, Montes Claros-MG, Governador Valadares-MG, Araçatuba-SP, Santarém-PA, Corumbá-MS, Teresina-PI, Natal-RN, São Luís-MA, Fortaleza-CE, Camaçari-BA, Três Lagoas-MS, Campo Grande-MS e Palmas-TO (Franca-Silva *et al.*, 2003, Ministério da Saúde, 2009, Malaquias *et al.*, 2007; Coura-Vital *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012; Brazuna *et al.*, 2012; Barata *et al.*, 2013; Coura-Vital *et al.*, 2013).

A região metropolitana de Belo Horizonte é um bom exemplo desse processo de urbanização, onde o crescimento populacional desordenado, a susceptibilidade da população à infecção e a adaptação do vetor ao ambiente urbano levaram a um crescimento no número de municípios com notificações de LV, indicando uma ampliação da taxa de transmissão nestas áreas na última década (Cunha *et al.*, 1995; Profeta da Luz *et al.*, 2001; Coura-Vital *et al.*, 2013). Neste contexto, a notificação de casos de LV passou de seis municípios na região metropolitana de BH/MG no período de 1994/1995 para 15 municípios no período de 1998/1999 (Profeta da Luz *et al.*, 2001). Segundo dados da Gerência de Epidemiologia e Informação da cidade, no ano de 2006 foram observados 8.101 amostras positivas entre os 82.379 cães avaliados, que representa uma prevalência da ordem de 9,83% (Prefeitura de Belo Horizonte, 2007).

Na tentativa de se estabelecer medidas de controle da LV, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza como prática profilática o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida com efeito residual em domicílio e peridomicílio, além da eutanásia de cães (Deane, 1956; Tesh, 1995; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Ministério da Saúde, 2009). Apesar destas medidas aplicadas em centros urbanos, os resultados surgem apenas a médio ou longo prazo, e sem garantia de sucesso, na redução de LV humana e canina (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Para que o controle da LV seja realmente eficaz, as medidas devem ser mantidas durante longo período e, mesmo assim, é freqüente a reativação dos focos, uma vez que o combate ao vetor não tem logrado sucesso (Alvar *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, pesquisas sobre infecção por *L. infantum* em cães sugerem que o controle da LVH é altamente depende de um controle efetivo da LVC. A incidência está aumentando e as perspectivas de controle ainda estão muito dependentes dos avanços científicos para obter melhorias no diagnóstico rápido da LVC. Embora a prevalência da infecção de *Leishmania* sp em cães na América do Sul varie muito de região para região, principalmente de acordo com o método de diagnóstico utilizado (sorológico ou molecular), geralmente é superior que 25% (Zerpa *et al.*, 2003; Alvar *et al.*, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2008;) e pode ser tão alta quanto 75% em focos endêmicos (Cortada *et al.*, 2004), sendo observado na maioria dos focos de LVH no Brasil a íntima relação com as áreas onde se encontram altos índices de soroprevalência canina (Coura-Vital *et al.*, 2011; Coura-Vital *et al.*, 2013).

Em função da estreita relação homem-cão na sociedade atual, a eutanásia de cães soropositivos que consiste em importante medida sanitária recomendada pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), torna-se cada vez mais questionável e inaceitável (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Costa, 2011; Ribas *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013). Além disto, muitos animais de áreas endêmicas são assintomáticos, mas possuem elevado parasitismo cutâneo e são fonte de infecção para o vetor (Molina *et al.*, 1994, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a, Quinnell & Countenay, 2009; Laurenti *et al.*, 2013). De 1990 a 1994, mais de 80.000 animais foram eutanasiados no Brasil e durante o mesmo período, houve um aumento de quase 100% na incidência de LVH (Dietze *et al.*, 1997). Em outro estudo, do final da década de 90, mostra que mais de dois milhões de cães foram rastreados por técnicas sorológicas e mais de 160.000 cães soropositivos foram eliminados, mas as incidências de LV canina

e humana não foram reduzidas a um nível aceitável (Braga *et al.*, 1998; Courtenay *et al.*, 2002; Coura-Vital *et al.*, 2011; Coura-Vital *et al.*, 2013).

Infelizmente, até o momento, não há qualquer esquema terapêutico eficaz na promoção da cura parasitológica dos animais com LVC (Noli & Auxilia, 2005), de forma a impedir a transmissão do parasito a flebotomíneos, e que seja aprovado pelo MS do Brasil no tratamento de cães doentes. Além disto, o tratamento da LVC pode possibilitar a seleção de cepas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano e por isto o emprego da terapêutica anti-LVC tem sido contra indicada e proibida quando se trata da utilização de antimoniais pentavalentes ou de outras drogas leishmanicidas utilizadas no tratamento humano (MS/Brasil, 2009). Neste sentido, considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz (Neogy *et al.*, 1994, Moreno *et al.*, 1999, Rhalem *et al.*, 1999, Baneth & Shaw, 2002, Nieto *et al.*, 2003, Noli & Auxilia, 2005, Saridomichelakis *et al.*, 2005, Pasa *et al.*, 2005, Vouldoukis *et al.*, 2006) e que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, e que há possibilidade de surgimento de novas epidemias, vacinas contra LVC podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a doença canina e impedir a infecção humana, levando a OMS a estimular o desenvolvimento de pesquisas que busquem potenciais vacinas contra LVC (O'Hagan & Valiante, 2003). No entanto, até o momento, ainda não existe uma vacina contra LVC que seja recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil para ser empregada no programa de controle da LV (MS, 2005; MS, 2007; MS, 2009b).

Estudos recentes baseados no modelo analítico computacional de Markov para avaliar o valor econômico de uma potencial vacina preventiva contra leishmaniose em sete países da América Latina: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, México, Peru e Venezuela, indicam que, uma vacina que forneça uma duração de cinco anos de proteção e com no mínimo de 50% de eficácia, poderia ser recomendada para utilização em campanhas de saúde pública, pois o custo-benefício é alto em comparação com o custo da quimioterapia convencional, além de impedir um número substancial de casos da doença (Bacon *et al.*, 2013).

2.2 - Biomarcadores de imunogenicidade e eficácia vacinal na leishmaniose visceral canina

Os estudos de aspectos imunopatológicos na LV empregam, principalmente, modelos experimentais como: camundongos, hamsters e cães. Entretanto, o curso da infecção em cada um destes modelos apresenta características próprias na evolução da doença (Hommel *et al.*, 1995; Garg & Dube, 2006). É importante ressaltar que o cão é considerado o melhor modelo experimental para o estudo da LV, pois apresenta curso da infecção semelhante à doença humana, além de ser o principal alvo das medidas de controle (Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Reis *et al.*, 2009).

Em relação à imunidade protetora e aos processos imunopatológicos, durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, evidências experimentais demonstram que os aspectos referentes ao parasito e ao hospedeiro podem influenciar de maneira crucial o curso da infecção. Neste sentido, a incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção pode estar relacionada a dois fatores principais: (i) o estabelecimento de um perfil de imunidade celular e humoral capaz de favorecer a formação de um microambiente apropriado para a instalação do parasito; (ii) a capacidade de algumas cepas de *Leishmania* resistirem aos efeitos microbicidas ocorridos durante os processos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (Grimaldi & Tesh, 1993).

Nas duas últimas décadas nosso grupo de pesquisa, mediante à importância do cão como modelo experimental, têm realizado diferentes estudos na tentativa de compreender melhor o curso da infecção e identificar biomarcadores de resistência e susceptibilidade que possam nortear o desenvolvimento e testes de imunobiológicos anti-LVC. Estes estudos foram fundamentais no estabelecimento de estratégias experimentais que permitissem uma melhor compreensão dos eventos relacionados à imunogenicidade pós-vacinal, orientando a busca racional de vacinas anti-LVC (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Desta forma, entre os biomarcadores de resistência na LVC destacam-se: (i) a presença predominante de IgG1 associada a menor frequência de intensidade parasitária em diversos tecidos (Reis *et al.*, 2006c); (ii) aumento de linfócitos T circulantes totais e de suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) no sangue periférico (Reis *et al.*, 2006b), (iii) aumento de esplenócitos T totais e de suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) antígenos específicos (*in vitro*), principalmente T (CD8⁺) (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2014), (iv) alterações histopatológicas leves ou moderadas na pele, fígado, baço e linfonodo poplíteo, acompanhado frequentemente por menor carga parasitária (Giunchetti *et al.*, 2004, Giunchetti *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b, Reis *et al.*, 2009) e (v) perfil misto de citocinas, com

elevada produção preferencial de IFN- γ , TNF- α e IL-13 (Pinelli et al., 1995; Menezes-Souza et al., 2011; Menezes-Souza et al., 2012).

A busca desses biomarcadores vem sendo empregada como estratégia para análise da imunogenicidade em cães vacinados contra *L. infantum*. Considerando a atual carência de estudos bem padronizados seja pela via do desafio experimental, bem como da concentração de *Leishmania* faz-se necessário a realização de estudos comparativos empregando as mesmas condições, para melhor determinar a proteção de potenciais vacinas contra LVC em uma mesma plataforma de ensaio clínico. Desta forma, estudos que busquem candidatos vacinais avaliados em um mesmo ensaio clínico de Fase I e II empregando-se desafio experimental endovenoso com altas concentrações de promastigotas em cães, além de ser uma rápida estratégia para avaliar a eficácia vacinal, auxiliam na identificação do melhor candidato para ser testado em ensaios clínicos de fase III em áreas endêmicas (Moreno et al., 2007; Reis et al., 2010).

Estudos de imunogenicidade têm sido realizados em ensaios de canis fechados (Giunchetti et al., 2007, 2008 a, b ; Araújo et al., 2008, 2009; Lasri et al., 1999; Holzmuller et al., 2005;) antes e depois do desafio experimental com promastigotas *L. infantum* (Moreno et al., 2007; Fujiwara et al., 2005; Lemesre et al., 2005; Mayrink et al., 1996; Molano et al., 2003; Ramiro et al., 2003; Rafati et al., 2005; Poot et al., 2006; Saldarriaga et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Ramos et al., 2008; Roatt et al., 2012). Tais estudos permitiram a pré-seleção de um conjunto de características imunológicas capazes de identificar biomarcadores determinantes da imunogenicidade de vacinas anti-LVC, bem como estabelecer diferentes abordagens para avaliar a eficácia vacinal.

Neste contexto, a abordagem *in vitro* utilizando a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi o primeiro biomarcador usado para investigar a resposta imune celular em cães vacinados (Lasri et al., 1999; Mayrink et al., 1996; Rafati et al., 2005; Saldarriaga et al., 2005; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Moreno et al., 2007; Giunchetti et al., 2007, 2008a,b; Ramos et al., 2008;). Esta abordagem é uma ferramenta importante na determinação da resposta imunológica específica frente ao antígeno parasitário. Neste sentido, a presença de atividade linfoproliferativa positiva *in vitro* representa um forte biomarcador de imunogenicidade associado à potência vacinal (Reis et al., 2010).

Para melhor caracterizar a imunogenicidade de vacinas anti-LVC, o perfil celular é outra abordagem que tem sido, nos últimos anos, empregada para avaliar a

resposta imune em cães seja utilizando técnicas de imunofenotipagem de leucócitos circulantes (ensaios *ex vivo*), bem como pela determinação do perfil imunofenotípico de CMSPs por citometria de fluxo, após estímulos *in vitro* com antígenos específicos (Giunchetti *et al.*, 2007, 2008a,b; Araújo *et al.*, 2008, 2009; Ramos *et al.*, 2008; Borja-Cabrera *et al.*, 2008;). O aumento da frequência de linfócitos T (CD5⁺, CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (CD21⁺) no sangue periférico, além da subpopulação T CD8⁺ e linfócitos B CD21⁺ *Leishmania*-específicos *in vitro* são vistos como os principais biomarcadores de resposta imune protetora e indicativa de eficácia vacinal (Giunchetti *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008; Borja-Cabrera *et al.*, 2008).

Outra abordagem empregada como biomarcador de imunidade celular vacinal efetora são as estratégias de avaliação da atividade leishmanicida através da determinação da capacidade microbicida de macrófago. Um dos biomarcadores mais comuns neste contexto é a avaliação de óxido nítrico (NO) em soros, sobrenadante de culturas estimuladas ou mesmo em tecidos, por imuno-histoquímica ou expressão de RNA, que servem como indicadores indiretos da atividade microbicida e são sugeridos como um forte indicador de resistência na LVC (Panaro *et al.*, 1998; Pinelli *et al.*, 2000; Sisto *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2011). Adicionalmente, as análises de NO no soro ou sobrenadante de culturas *in vitro* de CMSP estimuladas com antígenos vacinais ou do parasito foram também aplicadas como um biomarcador de imunidade protetora contra *L. infantum*. Os níveis de NO aumentados em cães vacinados têm sido mostrados como um indicativo de função imunológica importante na proteção induzida por vacinas (Holzmuller *et al.*, 2005; Giunchetti *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012). Foi demonstrado uma capacidade de eliminação de amastigotas de *Leishmania* em macrófagos co-cultivados com linfócitos autólogos derivados de cães vacinados com a vacina LiESAp (CaniLeish) superior ao encontrado nos macrófagos de cães controle (Lemesre *et al.*, 2007; Holzmuller *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a investigação de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10) em sobrenadante de cultura de CMSPs estimuladas com antígenos de *Leishmania* através da técnica de ELISA (Lemesre *et al.*, 2005; Holzmuller *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2008), ou por meio da análise da expressão de mRNA por PCR em tempo real em culturas ou tecidos (Rafati *et al.*, 2005; Poot *et al.*, 2006; Saldarriaga *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008; Roatt *et al.*, 2012), foram também adotadas para a identificação de padrões imunológicos em cães vacinados antes e após o desafio experimental. Estes

estudos mostraram que o IFN- γ é um biomarcador de alta qualidade na identificação de uma vacina imunogênica e protetora contra a infecção por *Leishmania* (Reis *et al.*, 2010).

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa investiu esforços na caracterização da produção das citocinas IFN- γ e IL-4 em CMSPs de cães submetidos à vacinação anti-LVC (nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺). Este estudo enfatizou a presença dos linfócitos T produtores de IFN- γ como indicativo de imunidade protetora e, atualmente, esta é uma das abordagens mais inovadoras no estudo de imunogenicidade de candidatos vacinais (Araújo *et al.*, 2009). Outra ferramenta utilizada na identificação da origem celular de IFN- γ , é a determinação por ELISpot da frequência de células secretoras de IFN- γ após a estimulação com antígeno de *Leishmania* (Moreno *et al.*, 2012). Este tipo de ensaio mostrou sua utilidade na determinação do estado imunológico em humanos e macacos infectados por *Leishmania* (Freidag *et al.*, 2003 Nylén *et al.*, 2006), embora tenha sido pouco utilizado para avaliar a resposta imune em cães (Moreno *et al.*, 2012).

Embora a produção de uma resposta imune humoral não seja diretamente relacionada com proteção derivada da vacinação anti-*Leishmania*, alguns estudos têm proposto a análise de IgG e seus isotipos (IgG1 e IgG2) como biomarcadores imunológicos complementares. Considerando que as respostas IgG1 e IgG2 são em grande parte dependentes (originárias) da produção de citocinas por linfócitos T e outras populações celulares, a avaliação de isotipos anti-*Leishmania* têm sido em geral, para a avaliação indireta da imunidade em cães (Fujiwara *et al.*, 2005). A utilização desses marcadores nos estudos imunopatológicos ou em ensaios de imunogenicidade de vacinas contra LVC é duvidosa e controversa, sobretudo na avaliação de resistência/suscetibilidade à doença. Uma vez que para identificação das subclasses IgG1 e IgG2 vem sendo utilizado anticorpos policlonais que não são subclasse específica (Day *et al.*, 2007). Além disto, até o momento, ainda não se identificou nenhuma correlação entre perfis de citocinas *versus* subclasses de IgG na LVC de modo a prever perfis de resistência e suscetibilidade à doença e mesmo proteção vacinal.

Em contrapartida, a possibilidade do emprego de técnicas que utilizam da pesquisa de IgG Total anti-*Leishmania* após a vacinação é considerada crucial para a diferenciação entre cães vacinados e infectados em regiões endêmicas durante as campanhas de controle governamental (Andrade *et al.*, 2008). Este diferenciação é de

fundamental importância para a distinção de cães doentes dos vacinados, se tornando inclusive uma exigência do MS (MS/Brasil, 2005, 2007, 2009) a ser cumprida pelas vacinas anti-LVC disponíveis no mercado. Atualmente, há algumas alternativas que permitem a identificação de cães vacinados dos cães infectados. Uma delas é a utilização da ELISA r-K39 ou mesmo testes imunocromatográficos (Pedras *et al.*, 2008; Lemos *et al.*, 2008; de Lima *et al.*, 2010; Quinell *et al.*, 2013) que utilizam deste e de outros antígenos como é o caso do DPP[®] (*Dual Path Platform*) atualmente empregado no diagnóstico da LVC no Brasil (Burns-Jr *et al.*, 1993; Coura-Vital *et al.*, 2014). Nosso grupo de pesquisa também tem investido esforços em diagnósticos capazes de diferenciar cães vacinados de cães infectados por *L. infantum*. Neste horizonte, nos últimos anos foi desenvolvida uma inovação no diagnóstico sorológico para LVC empregando a sorologia por citometria de fluxo (Andrade *et al.*, 2009; Ker *et al.*, 2013). Tais alternativas de diagnóstico podem auxiliar, em um futuro próximo, na decisão de medidas de controle, como por exemplo, nas decisões de eutanásia de cães soropositivos.

Em geral, a eficácia de uma vacina protetora contra *Leishmania* tem sido avaliada por diversos métodos, que incluem: (i) isolamento do parasito em diferentes tecidos (baço, fígado e principalmente medula óssea) em meio de cultura; (ii) pesquisa de amastigotas em impressões por aposição de esfregaços em lâminas (pesquisa de formas amastigotas presentes: pele, medula óssea, fígado, linfonodos, baço); (iii) técnicas moleculares como PCR convencional e mais atualmente PCR em tempo real (sangue, medula óssea, linfonodo, baço) (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2003; Rafati *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2005, Roatt *et al.*, 2012). A utilização de abordagens alternativas para determinar a carga parasitária, como a PCR em tempo real, é altamente relevante para avaliar diferentes níveis de proteção vacinal, e mais recentemente substituiu as avaliações parasitológicas convencionais como: “Leishman Donovan Units” (LDU), determinada pela contagem do número de formas amastigotas em 1.000 células nucleadas, seguida ou não da multiplicação pelo peso do órgão (Giunchetti *et al.*, 2006, 2008a,b; Reis *et al.*, 2009); imuno-histoquímica anti-*Leishmania* (Giunchetti *et al.*, 2006, 2008a,b; Reis *et al.*, 2009) em diferentes tecidos alvo (medula óssea, pele, baço, fígado, linfonodos) do parasito de *Leishmania*. Por outro lado, a avaliação do estado clínico como uma abordagem para acessar a eficácia vacinal não deve ser recomendada unicamente, devido à subjetividade e inespecificidade desta prática. Cabe ressaltar do grande número de animais assintomáticos que são fonte de

infecção para flebotomíneos e que escapariam das avaliações clínicas sendo então considerados animais protegidos pela vacina (Molina *et al.*, 1994, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006^a, Quinnell & Countenay, 2009; Laurenti *et al.*, 2013).

O xenodiagnóstico é uma das mais importantes ferramentas na avaliação de potenciais vacinas, permitindo identificar o potencial de bloqueio da transmissão de *L. infantum* da pele de cães vacinados para flebotomíneos. Tal metodologia foi exigida pelo MS na Instrução Normativa Interministerial, número 31(MS, 2009), como ferramenta fundamental para validação de vacinas contra LVC. Até o momento, existem poucos trabalhos publicados na literatura que fazem associação do xenodiagnóstico com o bloqueio da transmissão por candidatos vacinais. Bongiorno e colaboradores (2013) em um estudo preliminar com a vacina LiESP/QA-21 (CaniLeish[®]) ao realizarem o xenodiagnóstico com *Phlebotomus perniciosus* em 8 cães com infecção ativa (sorologia positiva e qPCR da medula óssea positiva) (3 controles não vacinados e 5 vacinados), 40,0% dos cães vacinados (2/5) e 66,7% cães não vacinados (2/3) foram capazes de infectar os flebotomíneos, interessante, um número menor de flebotomíneos alimentados nos cães vacinados foram positivos (10/82) quando comparados aos flebotomíneos alimentados nos cães controles (30/49) (Bongiorno *et al.*, 2013). Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2014) realizaram o xenodiagnóstico em cães vacinados com as duas vacinas comerciais disponíveis no Brasil, nos municípios endêmicos para LVC de Lauro de Freitas e Camaçari, ambos do Estado da Bahia, e observaram taxas de transmissão de *Leishmania* para o *Lu. longipalpis* de 5.1% (2/39) no grupo Leishmune[®], e 5.4% (2/37) no grupo Leish-Tec[®], os autores não evidenciaram diferença estatística entre as duas vacinas (Fernandes *et al.*, 2014).

Assim, a determinação dos níveis específicos de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, níveis das populações e sub-populações de linfócitos T e B, a expressão de IFN- γ , resposta imunoproliferativa específica a antígenos vacinais e/ou de *Leishmania*, atividade leishmanicida em macrófagos e carga parasitária representam atualmente abordagens indispensáveis na busca de biomarcadores confiáveis para a determinação da imunogenicidade e proteção induzida por potenciais vacinas contra a LVC.

Desta forma, diferentes ferramentas e abordagens na busca racional da potência de candidatos vacinais em ensaios de laboratório e de campo foram selecionadas por nós, afim de compor um ensaio clínico vacinal de Fase I e II comparativo entre as quatro vacinas aqui testadas. Nesta tese pretendemos usá-las no intuito de avaliar e quantificar correlações imunológicas e de eficácia comparativamente. A

correspondência entre os diferentes biomarcadores de imunidade nos permitirá confirmar se o grau de proteção induzida por uma vacina é forte e duradouro o suficiente para controle de infecção por *L. infantum*, assim como a progressão da doença. Os avanços obtidos neste campo representam não só um passo significativo no controle da LVC, mas sem dúvida também será um passo decisivo na obtenção de uma possível vacina para leishmaniose visceral humana, uma vez que o cão representa o melhor modelo experimental para estudar a LV.

2.3 - Vacinologia na leishmaniose visceral canina

O cão é o principal reservatório do ciclo epidemiológico da LV no domicílio e peridomicílio seja rural e urbano, e o desenvolvimento de uma vacina protetora contra LVC é uma alternativa consensual no que diz respeito à interrupção do ciclo de transmissão da LV (Tesh, 1995; Dye, 1996), e assim diminuir a infecção canina e humana. Há uma eminente necessidade de investir no desenvolvimento de vacinas profiláticas seguras para humanos e cães contra as leishmanioses, devido, principalmente, à resistência do parasito às drogas empregadas no tratamento, à toxicidade da quimioterapia, o aumento da incidência da doença em indivíduos imunocomprometidos, além das dificuldades enfrentadas pela vigilância epidemiológica onde uma das bases de controle da doença é a eutanásia de cães soropositivos (Tesh, 1995).

Uma vacina ideal contra LV deve ter várias propriedades, incluindo: (a) deve ser segura; (b) um número mínimo de imunizações capazes de induzir em longo prazo proteção contra a maioria ou todos os patógenos causadores da leishmaniose humana; (c) ser livre de produtos animais que são usados para fabricar o produto; (d) ter uma relação custo-eficácia viável à fabricação, e (e) deve ser eficaz no tratamento e prevenção da LV. Outros atributos também poderiam ser listados, como por exemplo: não necessitar de agulha para aplicação; ser dose única; não necessitar de reforço vacinal anual (Coler & Reed 2005).

No entanto, em se tratando de uma vacina contra um protozoário com aspectos biológicos tão complexos, estas propriedades seriam de difícil obtenção. Adicionalmente, uma vacina contra LVC deveria ainda apresentar algumas peculiaridades como: (i) indução de mecanismos imunoprotetores efetivos, (ii) impedir

a transmissão vetorial e (iii) permitir a diferenciação sorológica entre cães vacinados dos naturalmente infectados por *L. infantum*.

A maioria dos conhecimentos atuais sobre vacinas anti-LV baseiam-se em estudos de Fase I empregando camundongo como modelo experimental e apesar de sua importância, estes estudos muitas vezes são erroneamente extrapolados para o modelo canino ou humano (Seok *et al.*, 2013). Muitas das tentativas vacinais com novos imunoproliféricos no modelo murino também não foram testadas em humanos ou cães em ensaios vacinais de Fase I, II ou III (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010).

De acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), ensaios vacinais de Fase I são projetados para comparar indivíduos imunizados daqueles tratados com placebo, visando avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina. Já os ensaios vacinais de Fase II são destinados a verificar a proteção vacinal contra um desafio experimental. Além disto, os ensaios de Fase II no modelo canino também indicam uma estimativa de potência/eficácia nestas condições experimentais. Embora sejam necessárias a fim de padronizar a dose da vacina, via e calendário anterior ao teste de campo, eles são limitados em função do desafio experimental (OMS, 2010). Já os ensaios de Fase III analisam a eficácia da vacina contra a infecção nas condições naturais onde a doença ocorre, ou seja, em áreas endêmicas. De um modo geral todos estes ensaios devem ser realizados como estudo duplo-cego randomizado com quantidades de indivíduos suficientes (dezenas de milhares) calculados por epidemiologistas com base na incidência da doença preferencialmente em áreas de alta endemicidade em que se pretende testar a vacina. Se uma vacina passar com sucesso por essas etapas, a formulação pode ser transmitida ao registro e à industrialização e ser utilizada em ensaios de Fase IV com maiores populações (10.000-100.000 indivíduos) como parte de campanhas nacionais de imunização. Por razões éticas, dado o benefício da vacina, em ensaios de Fase IV controles tratados com placebo não são usados e a eficácia da vacina é medida pela comparação da incidência da doença antes e depois do tratamento vacinal (OMS 2010). Cabe lembrar que, até o momento, ainda não temos estudos de Fase IV sendo realizados sob estes moldes no mundo para uma vacina contra LVC.

O grande número de casos de LV humana e canina descritos nos últimos anos tem estimulado diferentes grupos de pesquisa no desenvolvimento de imunoproliféricos anti-LVC (Mayrink *et al.*, 1996; Genaro *et al.*, 1996; Mohebbali *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Giunchetti *et al.*, 2008d; Araújo *et al.*, 2008;

Araújo *et al.*, 2009; Borja-Cabrera *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007; Holzmüller *et al.*, 2005a; Lemesre *et al.*, 2005, 2007; Bourdoiseau *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2008; Fujiwara *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; Gradoni *et al.*, 2005; Molano *et al.*, 2003; Carcelén *et al.*, 2009; Poot *et al.*, 2009; Ramiro *et al.*, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2010; Roatt *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; Fiuza *et al.*, 2013;).

A primeira geração de vacinas contra a leishmaniose, preparadas com parasitos totais inativados, foram considerados promissores devido a sua facilidade de produção e baixo custo. Estas vacinas têm sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores nos últimos 20 anos, e vem demonstrando que estas vacinas apresentam segurança e induzem imunogenicidade e proteção, podendo constituir em futuras vacinas efetivamente profiláticas (Noazin *et al.*, 2008).

Resultados promissores empregando-se vacinas de primeira geração contra LVC têm sido descritos. Ensaios de Fase I e II empregando-se uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao BCG como adjuvante revelaram proteção de 90% em cães experimentalmente infectados com *L. infantum* (Mayrink *et al.*, 1996). Entretanto, ao se testar esta composição vacinal, em ensaio clínico vacinal duplo-cego randomizado de Fase III no Município de Montes Claros–MG não foi possível identificar mecanismos imunoprotetores contra a infecção natural por *L. infantum* (Genaro *et al.*, 1996). Porém estes pesquisadores realizaram um segundo estudo de Fase III em Montes Claros entre 1995-1998 e os resultados obtidos após a vacinação mostraram uma proteção de 67% após um ano de exposição dos cães (Dados não publicados).

No Irã, um estudo de Fase III avaliou uma vacina com antígeno total de *L. major* (ALM) associado ao BCG como adjuvante contra LVC, sendo observado 69% de redução na soroconversão de cães vacinados (Mohebbali *et al.*, 2004). Mais recentemente, tem sido demonstrado que outra vacina contra LVC composta por promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi capaz de induzir a expansão de linfócitos T CD8⁺ e a atividade linfoproliferativa *Leishmania*-específica em cães (Giunchetti *et al.*, 2008d).

Outro estudo empregando-se uma vacina constituída por promastigotas de *L. amazonensis* associado ao BCG como adjuvante foi avaliada em paralelo ao grupo composto pela vacina Leishmune[®] (Fort Dodge Saúde Animal Ltda) (Araújo *et al.*, 2008, Araújo *et al.*, 2009). Embora os cães não tenham sido desafiados

experimentalmente, este trabalho possibilitou a compreensão de importantes eventos envolvidos na resposta imune pós-vacinal. Neste contexto, foi observado que tanto o grupo vacinado com o imunógeno constituído por antígeno bruto de *L. amazonensis* como pela Leishmune[®] apresentaram uma resposta imune com envolvimento tardio preferencialmente de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), com aumento específico da produção de citocina intracitoplasmática IFN- γ em CMSP submetidas à cultura com antígeno de *L. infantum*. Em ambos imunógenos foi observado o envolvimento de linfócitos T CD8⁺, que vem sendo associado a mecanismos imunoprotetores na LVC (Reis *et al.*, 2006b; Reis *et al.*, 2010).

Estes resultados estimularam a utilização de antígenos totais como potenciais candidatos à vacina contra LVC, considerando que são capazes de promover resposta imune celular e reduzir a taxa de infecção (Mayrink *et al.*, 1996) ou mesmo propiciar a modulação do sistema imune, desencadeando uma resposta celular com envolvimento de linfócitos T CD8⁺ (Araújo *et al.*, 2008), importantes para resistência à infecção por *L. infantum* (Reis *et al.*, 2006b). Devido a isto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento biotecnológico de vacinas de primeira geração, neste contexto, duas vacinas, foram recentemente, desenvolvidas (**LBSap**: composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina; e **LBSapSal**: mesma composição da vacina LBSap acrescida de extrato de glândula salivar de flebotomíneos) e revelaram grande potencial imunogênico por induzirem aumento dos níveis de linfócitos T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e B (CD21⁺) circulantes. Além de aumento na atividade de linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos, acompanhado de intensa atividade linfoproliferativa e elevada produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. No contexto da resposta imune humoral (anticorpos), foram detectados elevados níveis de anticorpos IgG total e das subclasses (IgG1 e IgG2) anti-*Leishmania* (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008d). 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.*, 2009; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008). Mais recentemente, ao avaliarmos a imunogenicidade/proteção das vacinas LBSap e LBSapSal após desafio intradérmico com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* mais SGE de *L. longipalpis* observamos níveis mais elevados de IgG total anti-*Leishmania*, bem como de IgG1 e IgG2, em ambas as vacinas. Além disso, os cães vacinados com LBSap e LBSapSal tinham aumentado os níveis de linfócitos circulantes, particularmente das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, e também apresentaram uma resposta

imune específica *in vitro*, com intensa proliferação de linfócitos específicas quando estimulados com antígeno solúvel vacinal bem como com o antígeno solúvel de *L. infantum*, mesmo após 885 dias do desafio experimental. Os cães vacinados com LBSap bem como com a vacina LBSapSal apresentaram redução significativa da carga parasitária do baço (Roatt *et al.*, 2012; Aguiar-Soares *et al.*, 2014).

Candidatos vacinais de segunda geração têm sido estudados nos últimos anos podendo ser agrupadas em quatro tipos de estratégias vacinais mais comumente utilizadas: (i) vacinas vivas; (ii) vacinas que utilizam veículos que facilitam o endereçamento antigênico; (iii) vacinas baseadas em antígenos purificados de *Leishmania*; e (iv) vacinas com antígenos recombinantes.

Na categoria de vacinas vivas podemos incluir as vacinas com *Leishmania* spp. geneticamente modificadas, "knock out" *Leishmania* spp., onde genes essenciais na relação parasito-célula/hospedeira são depletados, como por exemplo, timidilato redutase dihidrofolato sintase (Cruz *et al.*, 1991), cisteína-proteinase (Souza *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1998) ou transportador de biopterina (Papadopoulou *et al.*, 2002). A proposta destas vacinas, é que estes parasitas "knock out" passam por um ciclo de vida curto, suficiente para gerar uma resposta imune específica causando infecção abortiva e não acometimento da doença ao homem. Outra abordagem surgiu após a conclusão do genoma da *Leishmania* spp. que possibilitou a inclusão de "cassetes suicidas" incluindo genes sensíveis a drogas (Muyombwe *et al.*, 1998; Davoudi *et al.*, 2005).

Recentemente, Fiuza e colaboradores (2013) avaliaram o perfil de resposta imune em cães de uma vacina com parasitos vivos atenuados de *L. donovani* com deleção no centrin [LdCen (-/-)]. A vacinação com LdCen (-/-) levou a produção de anticorpos-específicos (IgG Total, IgG1, IgG2), maiores frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além de linfócitos TCD8⁺ produtores de IFN- γ , foi também observado uma resposta linfoproliferativa *in vitro* com aumento da secreção das citocinas TNF- α e IL-12/IL-23p40, com diminuição da secreção de IL-4. Embora geneticamente modificadas de forma a impedir a infecção, estas vacinas por apresentarem o parasito vivo trazem impedimentos éticos que podem inviabilizar seu uso, além da dificuldade em viabilizar sua produção e comercialização, principalmente, com relação a preservação por longo período. Por outro lado, servem de protótipos para estudarem a resposta imune com objetivo de identificarmos os melhores biomarcadores de imunogenicidade e proteção vacinal.

Outra abordagem para vacinas de segunda geração inclui o uso de subfrações purificadas de *Leishmania*. Neste tópico, se destacam os resultados obtidos pelas vacinas LiESAp-MDP (Holzmuller *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2005; 2007; Bourdoiseau *et al.*, 2009), e FML-saponina, comercialmente conhecida como Leishmune[®] (Borja-Cabrera *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002).

A vacina composta por uma proteína 54 kDa excretada de promastigotas de *L. infantum* associada ao adjuvante *muramyl dipeptide* (MDP) apresenta-se altamente promissora, considerado os resultados de Fase III realizado no sul da França revelando eficácia vacinal de 92% (Lemesre *et al.*, 2007).

Mais recentemente, encontra-se em circulação a primeira vacina contra LVC licenciada nos países da comunidade europeia (CaniLeish[®], Virbac Saúde Animal). A vacina LiESP/QA-21 (denominada comercialmente de CaniLeish[®]) é composta por proteínas secretadas e excretadas em meio de cultura de *L. infantum* em associação com o adjuvante QA-21 (saponina purificada componente do Quil-A). Moreno *et al.* (2012) demonstraram que a vacinação em cães com LiESP/QA-21 leva a uma resposta humoral caracterizada pela produção de IgG2, reatividade celular específica aos antígenos solúveis de *Leishmania*, com uma linfoproliferação específica caracterizada por um aumento de linfócitos T produtores de IFN- γ e uma significativa capacidade dos macrófagos em reduzir a carga parasitária intracelulares, *in vitro*, após o co-cultivo com os linfócitos autólogos de cães vacinados, pela indução da via de NOS e produção de derivados de NO. Atualmente, esta vacina encontra-se em testes clínicos vacinais de Fase III em campo. Entretanto, até o momento, nenhum estudo de eficácia ou proteção vacinal em ensaio clínico de Fase III foi publicado, bem como, da eficácia vacinal após o desafio experimental em ensaio clínico de Fase II.

A preparação glicoprotéica enriquecida de promastigotas de *L. donovani*, nomeado FML (fucose-manose ligante) (Palatnik *et al.*, 1993), antigênica para uso humano (Palatnik *et al.*, 1995) e canino (Borja-Cabrera *et al.*, 1999), foi formulada com o adjuvante *Quillaja saponaria saponin* e passou por Ensaios de Fase I, II e III se tornando a primeira vacina contra LVC licenciada no Mundo com a denominação de Leishmune[®] (Parra *et al.*, 2007; Zoetis Brasil Saúde Animal). O antígeno FML revelou resultados promissores do ponto de vista imunogênico e imunoprolifático ou ainda como agente imunoterápico, em camundongos e hamsters (Santos *et al.*, 2002; Palatnik *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2003), e em ensaios vacinais de Fase III de campo com cães

demonstraram 92% a 95% de proteção contra a LVC no grupo vacinado correspondendo a 76% de eficácia vacinal (Borja-Cabrera *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2014) realizaram um estudo em cães vacinados com Leishmune[®] e Leish-Tec[®] em áreas endêmicas para LV na Bahia, demonstraram a detecção do parasito de *Leishmania* por esplenocultura e/ou PCR do baço em 11,1% (4/36) dos cães no grupo Leishmune[®], e 8,8% (3/34) no grupo Leish-Tec[®], os autores não evidenciaram diferença estatística entre as duas vacinas, inclusive no xenodiagnóstico realizado. (Fernandes *et al.*, 2014).

Outra vacina que se encontra disponível no mercado brasileiro para imunização contra LVC é a vacina Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal S/A), composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina (Fernandes *et al.*, 2008). Foram realizados ensaios pré-clínicos de Fase I e II em cães beagles empregando-se o desafio experimental endovenoso com 5×10^7 promastigotas de *L. infantum*, e ensaios vacinais de Fase III se encontram em fase de finalização. Nos ensaios de fase I e II foi relatado altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2, aumento significativo na produção de IFN- γ *in vitro*, e ao avaliarem a presença do parasito na medula óssea, em 4 dos 7 animais do grupo vacinado foram isolados parasito (Fernandes *et al.*, 2008).

Vários estudos têm avaliado a imunogenicidade e capacidade de proteção de um antígeno recombinante denominado KMP-11 (proteína 11 de membrana do cinetoplasto), através de uma vacina recombinante ou até mesmo do desenvolvimento de vacinas de DNA. Carrilo e colaboradores, avaliando a imunogenicidade da proteína recombinante KMP-11 mostraram que as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães experimentalmente infectados proliferaram em resposta a este antígeno recombinante KMP-11, com aumento do nível de expressão de mRNA de citocinas como IFN- γ , em contrapartida a baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 produzidas nas CMSP em resposta ao r-KMP-11, sugerindo um perfil de proteção na LVC (Carrilo *et al.*, 2008). Já Bhaumik e colaboradores mostraram que camundongos BALB/c desafiados com uma cepa virulenta de *L. donovani* e imunizados previamente com uma vacina de DNA KMP-11 apresentaram menor carga parasitária no baço e fígado. Os autores justificam esta diminuição devido à geração de uma resposta imune mista (Th1/Th2) (Bhaumik *et al.*, 2009). Mais recentemente, da Silva e colaboradores ao imunizarem hamsters com plasmídeos de DNA KMP11 associado ou não a plasmídeos de DNA LJM19, proteína salivar de flebótomo, observaram individualmente bem como com ambos os plasmídeos em conjunto, um perfil de proteção/imunogenicidade

bastante semelhante com indução de produção de IFN- γ em linfonodos drenantes aos 7, 14 e 21 dias pós-imunização, diminuição da carga parasitária no fígado e baço, além de um perfil hematológico normal mesmo após cinco meses do desafio (da Silva *et al.*, 2011).

Outra estratégia é a utilização de mais de uma proteína recombinante na composição vacinal, denominadas de vacinas fusionadas ou quiméricas, como por exemplo, na vacina composta por multicomponentes de proteínas fusionadas Leish-111f contendo os antígenos TSA (antioxidante tiol-específico), LmSTI1 (proteína 1 indutora de stress em *L. major*) e Leif (fator de iniciação de alongamento em *Leishmania*), foram imunogênicas em cães sem, no entanto, conferir proteção frente o desafio com *L. infantum* (Fujiwara *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007). Ainda assim, esses antígenos não foram capazes de prevenir a infecção natural por *L. infantum*, ou a progressão da doença em cães avaliados em canil aberto (Gradoni *et al.*, 2005).

Molano *et al.* (2003) avaliaram a administração intraperitoneal de uma proteína recombinante, formada pela fusão genética de cinco fragmentos intracelulares antigênicos de *L. infantum* (proteínas ribossomais ácidas, Lip2a, Lip2b, P0 e histona H2A) associado BCG (Soto *et al.*, 1998). Neste estudo, foram observados níveis de infecção de 10-50% em cultura de amostras de linfonodos em diferentes tempos de avaliação após o desafio experimental de cães com baixa dose de inóculo (5×10^5 promastigotas de *L. infantum*).

Carcelén *et al.* (2009) avaliaram um ensaio duplo-cego experimental em cães, a proteína quimérica “Q” de *Leishmania* administrados em dose simples (Q) ou dupla (Q+Q) sem adjuvante. Em 1/7 dos cães vacinados com dose simples (Q) e 4/7 dos cães vacinados com dose dupla (Q+Q) apresentaram PCR positiva na pele, em contraste com 6/7 de positividade em cães do grupo controle.

Poot *et al.* (2009) avaliaram a proteína recombinante JPCM5-Q em cães buscando identificar um adjuvante que apresentasse melhor desempenho. Neste estudo foram avaliados o dipeptídeo muralil (MDP), hidróxido de alumínio, Matrix C e *Propionibacterium acnes* morta, em combinação com *E. coli* ou baculovírus. Os resultados clínicos e parasitológicos obtidos durante os 10 meses de avaliação indicaram que a proteção não foi induzida por nenhuma das combinações de adjuvantes com a proteína recombinante JPCM5-Q.

Em 1995, surgiu a vacina de DNA como uma nova alternativa biotecnológica na vacinologia moderna e uma proposta de caminho a ser trilhado no futuro das vacinas

contra LVC (Waine and McManus, 1995). Essas vacinas são capazes de promover respostas imunes envolvendo células T CD4⁺ e CD8⁺, que podem ainda ser moduladas pela adição de citocinas e/ou oligonucleotídeos CpG (Alarcon, Waine e McManus, 1999; Restifo *et al.*, 2000). Também podem ser administradas por estratégias “prime-boost” que envolvem o condicionamento com o DNA e reforço com a proteína (McShane, 2002). Entretanto, poucos estudos utilizando estas proposições foram realizados em cães (Ramiro *et al.*, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b).

LACK é a vacina de DNA mais testada até o momento seja contra a LC ou LV (Gurunathan *et al.*, 1997, 1998, 2000; Zavala *et al.* 2001; Gonzalo *et al.*, 2002; Tapia *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2004). Um ensaio de vacinação contra LVC conduzido por Ramiro *et al.* (2003) utilizando DNA-LACK seguido por um reforço de Vaccinia vírus recombinante contendo mesmo gene revelou proteção de 60% após 17 meses de acompanhamento. Estes resultados altamente promissores em cães foram contrários a outros estudos em modelos murinos de imunização com LACK, onde não ofereceram nenhuma proteção contra leishmaniose tegumentar (Ahmed *et al.*, 2004; Dumonteil *et al.*, 2003) e visceral (Melby *et al.* 2001; Marques-da-Silva *et al.*, 2005).

Saldarriaga *et al.* (2006) conduziram um estudo de vacinação em cães empregando uma vacina de DNA multicomponente codificando 10 antígenos da *Leishmania* (H1, H2A, H2B, H3, H4, LACK, PSA-2, TSA / peroxidoxin, STI1 e ARP-1). Neste estudo, após o desafio com *L. donovani* foi observado indução da atividade linfoproliferativa e produção de IFN- γ conferindo redução da carga parasitária no linfonodo e em um modelo de infecção *in vitro*.

Um estudo realizado por Rafati *et al.* (2005) utilizando uma combinação para imunização com DNA e proteínas cisteína proteinases tipo I (CPB) e tipo II (CPA) de *L. infantum*, revelou após 12 meses do desafio com baixa dose (5×10^6 promastigotas de *L. infantum*) um resultado parasitológico de 20% de infecção em cães, utilizando-se PCR em amostras de sangue.

Um estudo adicional multi-antigênico com DNA plasmidial codificando quatro proteínas (KMP-II, TRYP, LACK e GP63) não conseguiu demonstrar a proteção contra desafio experimental por *L. infantum* em cães (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b).

Embora as vacinas de DNA contra a *Leishmania* tenham sido consideradas uma alternativa biotecnológica altamente promissora, o entusiasmo inicial de seu uso parece ter sido reduzido em função da necessidade de uma onerosa infra-estrutura e da

complexidade e dificuldades metodológicas (Kedzierski *et al.*, 2006), principalmente em países em desenvolvimento, além de na maioria das vezes levarem a resultados frustrantes no quesito proteção.

Nas últimas décadas, tem sido investigado o papel de componentes salivares de flebótomos no estabelecimento da infecção por *Leishmania* como uma estratégia para ser empregada no controle da doença. Considerando que flebotomíneos possuem dentro de sua secreção salivar uma grande diversidade de componentes farmacológicos potentes, tais como anticoagulantes (Charlab *et al.*, 1999), fatores antiplaquetários (Ribeiro *et al.*, 1999), vasodilatadores (Lerner *et al.*, 1991) e, sobretudo, imunomoduladores e moléculas anti-inflamatórias (Kamhawi *et al.*, 2000). Estes mediadores, com atividades redundantes e sinérgicas, fornecem um microambiente favorável para uma adequada alimentação sanguínea e também são importantes para o estabelecimento do parasito. Desta forma, vários estudos que abordam o transcriptoma da glândula salivar de flebotomíneos têm caracterizado e isolado um número de moléculas responsáveis por estes efeitos sobre a homeostase do hospedeiro e explorado a possibilidade de neutralizá-las (Anderson *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006) ou utilizá-las como potenciais vacinas anti-LVC. Neste sentido, Collin *et al.* (2009) analisaram cães imunizados com proteínas de saliva de *L. longipalpis* (LJL143 e LJM17) e desafiados com flebótomos não infectados ou infectados. Este estudo revelou uma resposta celular no local da picada caracterizada por infiltrado linfocitário e expressão de IFN- γ e IL-12. Estes resultados reforçam que o emprego de proteínas da saliva de *L. longipalpis* em cães poderia ser uma boa estratégia para compor uma vacina anti-LVC (Collin *et al.*, 2009).

Mediante o exposto e considerando que o cão tem papel central no controle da LV, e que ainda não há tratamento capaz de eliminar o parasito destes animais torna-se fundamental o desenvolvimento de vacinas anti-LVC. Devido à falta de consenso nos testes clínicos vacinais de Fase I e II, este trabalho se propôs avaliar a inocuidade, toxicidade, imunogenicidade e potência de dois protótipos vacinais, LBSap e KMP-11, de forma comparativa com as vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®], em um ensaio clínico vacinal de fase I e II em canil fechado, no sentido de melhorar a dinâmica da seleção de futuros candidatos vacinais visando os ensaios clínicos de Fase III, e auxiliando na busca de uma vacina efetiva que possa ser utilizada no Programa de Vigilância e Controle da LV como medida para combater a crescente expansão da LV.

3. Justificativa

A LV é uma doença que se apresenta em franco processo de expansão em diferentes regiões do Brasil e do mundo. O comportamento emergente e re-emergente em áreas rurais, periurbanas e urbanas tem-se atribuído a fatores relacionados principalmente ao cão, reservatório doméstico do parasito e mantenedor da transmissão. Até o momento, não existem alternativas terapêuticas capazes de conduzir à cura parasitológica em cães infectados e, conseqüentemente, reverter seu papel de reservatório no ciclo de transmissão. O PVCLV/MS/Brasil aplica a eutanásia de cães infectados (soropositivos) como uma das medidas oficiais que compõem o tripé de ações do controle da LV. O Brasil é o único país do mundo que pratica a eutanásia de cães soropositivos, e esta medida é altamente contestada, traumatizante e muitas vezes não é seguida pelos proprietários que escondem e transferem seus cães soropositivos para áreas indenes. Desta forma, a LVC se posiciona como um gravíssimo problema de saúde pública, tornando-se um desafio a ser solucionado pelas autoridades sanitárias e científicas de países endêmicos como o Brasil. Considerando o destaque de cães no contexto epidemiológico da LV a imunoprofilaxia canina surge como melhor alternativa para o controle desta doença negligenciada. Embora o Brasil possua duas vacinas comercialmente disponíveis para uso em clínicas veterinárias, o Ministério da Saúde, até o momento, não emprega nenhuma delas no PVCLV, justificada pela escassez de estudos de Fase I, II e principalmente de Fase III que comprovem sua imunogenicidade e eficácia, além de outros pontos como: capacidade de bloquear o ciclo da doença na fase de transmissão do parasito ao vetor; distinguir entre a infecção natural por *L. infantum* e a resposta imune vacinal nos testes sorológicos; avaliar se as vacinas reduzem a incidência da infecção e doença em cães; além do elevado custo de produção vacinal. Para reverter este cenário é de fundamental importância dinamizar e ampliar o conhecimento científico dos ensaios clínicos vacinais de Fase I, II e III. Neste sentido, a incorporação de novas estratégias metodológicas na investigação de toxicidade/inocuidade, imunogenicidade e eficácia são essenciais para melhor definir potenciais candidatos a uma vacina contra LVC, capazes de atender as prerrogativas reguladas pela IN-31 (IN-31/MS/MAPA, 2007) e assim ser direcionada para o prosseguimento em ensaios de Fase III em área endêmica.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa concentrou inúmeros esforços no estabelecimento de diversas metodologias criando um amplo espectro de abordagens aplicadas aos testes vacinais. Estes estudos possibilitaram o desenvolvimento e teste de dois novos imunobiológicos (LBSap e LBSapSal), além da realização de outros testes

com diferentes composições vacinais. Desta forma, o presente estudo pretende avaliar a toxicidade, imunogenicidade e potência dos protótipos vacinais KMP-11 e LBSap, comparativamente com as vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®], em uma ensaio clínico vacinal de Fase I e II em canil fechado, para validar uma potencial vacina contra LVC em cães experimentalmente infectados pela via endovenosa com 5×10^7 promastigotas de *L. infantum*. Assim, será possível o encaminhamento de forma rápida e dinâmica de potenciais vacinas (LBSap e KMP-11) para prosseguir com testes de Fase III em área de alta endemia para LV. Além disto, as novas metodologias que serão testadas e empregadas neste ensaio clínico vacinal contribuirão para ampliar o conhecimento científico no âmbito da imunogenicidade, através de uma análise detalhada e comparativa da resposta imune inata e adquirida entre diferentes vacinas, antes e após o desafio experimental.

4. Objetivos

4.1 – Objetivo Geral

Avaliar a inocuidade/toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap em um ensaio clínico de Fase I e II.

4.2 – Objetivos Específicos

Para cumprir com este objetivo geral, foi traçada uma estratégia experimental composta de três objetivos específicos constituídos em estudos de: inocuidade e toxicidade (Fase I); imunogenicidade (Fase I e II); e potência vacinal pós-desafio experimental (Fase II). É importante salientar que as principais avaliações deste estudo foram realizadas antes do início do protocolo de imunização (denominado T0), após o protocolo de imunização (denominado T1) e seis meses após o desafio experimental (denominado T2). Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

a) Realizar estudo de fase I para avaliar a **inocuidade e toxicidade** das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap após a administração de cada uma das três doses vacinais, empregando os seguintes parâmetros de avaliação:

- (i) Acompanhamento clínico: alterações macroscópicas no local do inóculo, dor, diarreia, tremores, alterações comportamentais, vômito, etc;
- (ii) Alterações fisiológicas: Medidas de temperatura retal °C e peso corporal;
- (iii) Avaliar o perfil hematológico através do eritrograma e leucograma;
- (iv) Quadro bioquímico da função renal e função hepática (uréia, creatinina, AST/TGO, ALT/TGP, gama-GT, fosfatase alcalina, bilirrubina, proteínas totais, albumina sérica e globulina sérica).

b) Realizar estudo de fase I e II (**imunogenicidade**) para investigar as alterações imunológicas no âmbito da resposta imune inata e adquirida (celular e humoral) através de avaliações *ex vivo* e *in vitro* após a administração das três doses vacinais empregando Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap, bem como pós-vacinação e submissão à infecção/desafio experimental, através da análise dos seguintes parâmetros:

- Avaliações *ex vivo*:

- (i) Quadro hematológico por hemograma completo automatizado;
- (ii) Perfil imunofenotípico por citometria de fluxo da frequência de linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺), monócitos (CD14⁺) e células NK (CD5⁻CD16⁺) do sangue periférico;
- (iii) Perfil de detecção no soro de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* empregando-se o teste imunocromatográfico rápido (RT DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e o ensaio imunoenzimático (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]);

- Avaliações *in vitro*:

- (i) Atividade linfoproliferativa e perfil imunofenotípico de subpopulações linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* por citometria de fluxo;
- (ii) Perfil de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de citocinas (IFN- γ e IL-4) intracitoplasmáticas após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* por citometria de fluxo;

(c) Realizar estudo de fase II (**potência**) para avaliar a capacidade de proteção das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap após infecção/desafio experimental com *Leishmania infantum*, através da análise dos seguintes parâmetros:

- (i) Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC;
- (ii) Punção de medula óssea: isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT (Mielocultura) e avaliação da carga parasitária por meio de PCR em tempo real;

5. Material e Métodos

5.1 - Obtenção da colônia de cães para os ensaios de Fase I e II no canil fechado da UFOP

A colônia de cães destinados aos ensaios de Fase I e II foi obtida a partir de matrizes e reprodutores do canil maternidade do Centro de Ciências Animal (CCA) da UFOP sob acompanhamento sistemático de uma equipe de veterinários incluindo membros do CCA/UFOP e médicos veterinários do grupo de pesquisa em Imunopatologia das Leishmanioses (CNPq/UFOP). Os cães receberam a medicação vermífuga a partir de 21 dias de idade, juntamente com as matrizes, três vezes inicialmente, com intervalo de 21 dias, seguido de outras três doses, com intervalo de três meses até atingirem idade de um ano. Todos os filhotes foram submetidos a um rigoroso manejo sanitário que contou com a vacinação contra cinomose, adenovírus tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovírus e leptospirose canina (Vanguard[®] HTLP 5/CV-L, Pfizer) que foi iniciada aos 45 dias de idade, totalizando três aplicações, conforme recomendação do fabricante. A vacinação anti-rábica (Vacina anti-rábica fuenzalida modificada[®], Tecpar) foi fornecida em dose única quando os filhotes completaram quatro meses de idade. A execução da presente tese foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Os experimentos foram iniciados quando os cães atingiram a idade adulta com média de idade de um ano e seis meses sendo que a diferença máxima de idade entre os cães foi de aproximadamente 3 meses. É importante ressaltar que os animais em experimentação serão mantidos em canil totalmente telado da UFOP, durante todo o ensaio de Fase I e II, para impedir o acesso de flebotomíneos. Todas as instalações do canil são submetidas à borrifação periódica trimestral com inseticida piretróide como medida auxiliar de combate a insetos.

5.2 - Desenho experimental

A) Produção dos antígenos vacinais e preparo do adjuvante saponina

O imunobiológico que constitui a vacina LBSap foi elaborado 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 mantidas e expandidas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM[®] modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C, sendo homogeneizadas diariamente. Após expansão e obtenção de volume necessário para

produção do antígeno vacinal, a cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a 900 x g durante 15 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e em seguida foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após as etapas de lavagem, realizou-se o rompimento das promastigotas em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor®- Brason Sonic Power Co. – EUA), por um minuto a 40 Watts em banho de gelo. Após este procedimento, o antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a -70°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A concentração dos antígenos protéicos utilizada em cada dose foi de 600 µg/mL em solução salina estéril. A produção do imunobiológico LBSap seguiu o protocolo patenteado pela UFOP em parceria com pesquisadores do Instituto René Rachou - FIOCRUZ/MG estando inscrito no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com a identificação PI 0601225-6; 17 de fevereiro de 2006.

A saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) utilizada neste estudo como adjuvante foi diluída em solução salina estéril 0,9% no momento do inóculo (1mg em cada dose diluída em 1 mL de solução salina estéril).

O imunobiológico que constitui a vacina de antígeno recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem Kinetoplastida de 11 kDa) de *Leishmania infantum* foi produzida conforme Carrillo *et al.* (2008) e utilizada na concentração de 100 µg por dose.

As vacinas LBSap e rKMP-11, em suas respectivas concentrações, foram ressuspendidas no momento de suas utilizações em 1 mL de solução salina estéril já contendo 1mg do adjuvante saponina previamente diluído por dose vacinal.

A concentração e o protocolo vacinal das vacinas comerciais Leish-Tec® e Leishmune® foram seguidas de acordo com a bula e respectivas recomendações dos fabricantes.

B) Grupos experimentais

Um total de 35 cães sem raça definida (SRD) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais compostos por 7 cães/grupo, de ambos os sexos, conforme descrito a seguir:

- **Grupo Controle:** composto por 7 cães (quatro machos e três fêmeas), que receberam três aplicações de 1 mL de solução salina estéril a 0,9% por via subcutânea, em intervalos de 21 dias;
- **Grupo LBSap:** composto por 7 cães (três machos e quatro fêmeas) cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg do antígeno de *Leishmania braziliensis* por dose associado a 1 mg do adjuvante saponina/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,9%, em intervalos de 21 dias;
- **Grupo Leishmune:** composto por 7 cães (quatro machos e três fêmeas), grupo imunizado com a vacina comercial Leishmune[®], conforme recomendação do fabricante (Fort Dodge Saúde Animal Ltda) (três imunizações em intervalos de 21 dias);
- **Grupo Leish-Tec:** composto por 7 cães (três machos e quatro fêmeas), grupo imunizado com a vacina comercial Leish-Tec[®], conforme recomendação do fabricante (Hertape Calier Saúde Animal S/A) (três imunizações em intervalos de 21 dias);
- **Grupo KMP-11:** composto por 7 cães (três machos e quatro fêmeas), cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 100 µg do antígeno recombinante KMP-11 por dose associado a 1 mg do adjuvante saponina/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,9%, em intervalos de 21 dias;

C) Delineamento experimental e abordagens investigativas

As amostras de sangue dos 35 cães para realização dos diferentes experimentos de inocuidade, imunogenicidade e potência foram coletadas nos intervalos previamente estabelecidos no cronograma de avaliação longitudinal (Diagrama1), desta forma, a primeira avaliação/coleta foi realizada antes da primeira dose vacinal (T0), seguido das avaliações/coletas realizadas 15 dias após a terceira dose vacinal (T1). A infecção experimental com 5×10^7 promastigotas de *L. infantum* foi realizada 60 dias após a terceira dose vacinal, sendo realizado avaliações/coletas do sangue periférico e punção de medula óssea dos animais no sexto mês (180 dias) pós-desafio experimental (T2).

O ensaio vacinal de Fase I e II proposto neste projeto apresenta uma grande amplitude de abordagens investigativas que envolvem diversos parâmetros de avaliação. O diagrama 1 mostra o delineamento experimental através da linha de tempo (12 meses) de seguimento, os respectivos grupos experimentais e os diversos parâmetros de avaliação. Durante o protocolo de três imunizações dos diferentes grupos experimentais

foi realizado um detalhado estudo de toxicidade/inocuidade empregando-se um rigoroso acompanhamento clínico por meio de avaliação sistemática e diária das alterações macroscópicas no local da imunização além de diarreia, tremores, alterações comportamentais, vômito, etc. Além disto, foram tomadas as temperaturas, peso e avaliação em soro do quadro bioquímico (função hepática, função renal e proteinograma).

O ensaio de Fase II compreendeu a avaliação da imunogenicidade após cada dose vacinal com o propósito de identificar as alterações imunológicas no âmbito da resposta imune inata e adquirida utilizando abordagens *ex vivo* e *in vitro* pós-vacinação. A avaliação do quadro hematológico, a análise do perfil imunofenotípico de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo, dosagem sérica de imunoglobulinas circulantes (através do EIE[®] e RT DPP[®]) fazem parte dos parâmetros investigativos no contexto *ex vivo* nos três tempos do acompanhamento longitudinal (T0,T1,T2). O estudo de imunogenicidade contou com uma abordagem investigativa *in vitro* nos tempos T0, T1 e T2, por meio da análise dos seguintes parâmetros: avaliação da atividade linfoproliferativa e da frequência de linfócitos LT (CD4⁺ e CD8⁺) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*; análise do perfil de linfócitos LT (CD4⁺ e CD8⁺) produtoras de (IFN- γ e IL-4).

Para investigar a capacidade de proteção após a infecção experimental foram empregadas metodologias em abordagens *ant mortem*. No contexto *ant mortem* foi feito um acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC, além da punção de medula óssea para mielocultura e realização da carga parasitária por PCR em tempo real (T2).

O Diagrama 1, apresentado a seguir, ilustra o delineamento experimental utilizado no estudo.

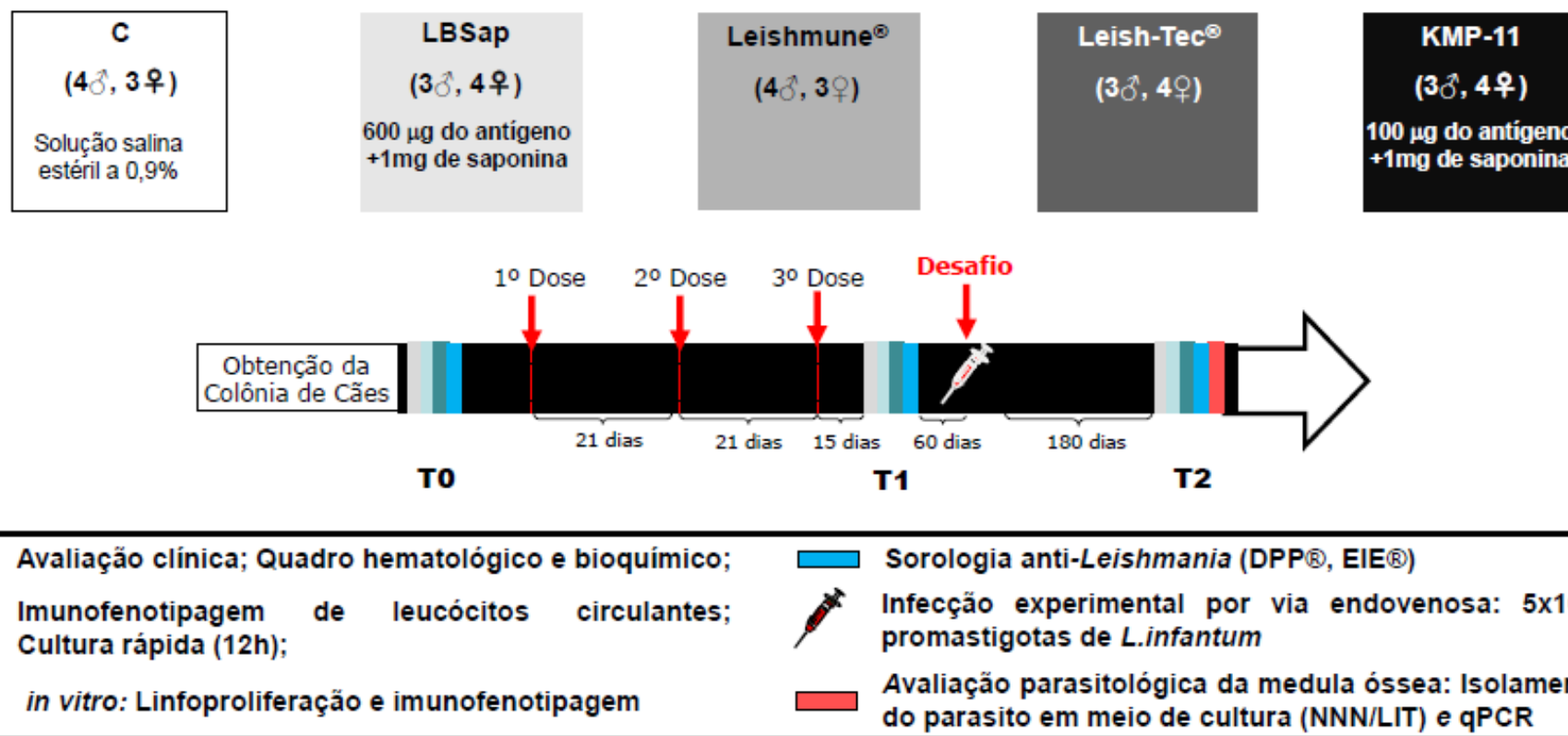


Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais e submetidos a infecção/desafio experimental com *L.infantum*: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem Kinetoplastida de 11 kDa, de *Leishmania infantum*); T0 = Antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 180 dias após a infecção experimental;

D) Infecção/Desafio Experimental

A infecção experimental foi realizada 60 dias após a terceira dose vacinal pela via endovenosa empregando-se uma concentração de $5,0 \times 10^7$ promastigotas de *L. infantum*, cepa C-46 (Braga, 2011), em sexta passagem (P6) de meio de cultura NNN/LIT em fase estacionária de crescimento. O preparo dos parasitos e o protocolo do desafio experimental seguem descritos a seguir:

Para infecção experimental foi empregado promastigotas obtidas de cultivo de *Leishmania (Leishmania) infantum* da cepa C-46 em meio ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT) em Erlenmeyers de 250 mL. As culturas foram armazenadas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, destinadas ao desafio experimental foram obtidas a partir da expansão de um inóculo inicial de 10 mL de meio LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura bifásico NNN/LIT. A cultura foi “repicada” para outros cinco erlenmeyers utilizando 10 mL de cultura contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL adicionados a 40 mL de NNN/LIT. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes sendo que no último repique, as culturas foram adicionadas apenas ao meio LIT para minimizar a presença de hemácias, de forma que ao final de 10 dias, foram obtidos em torno de 5.000 mL de cultura contendo promastigotas em fase estacionária (conforme curva de crescimento previamente estabelecida para esta cepa em nosso laboratório), na concentração entre 10^7 e 10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), submetidos à centrifugação a $400 \times g$ durante 10 minutos a 23°C . Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%), seguido de centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez.

Ao fim das lavagens as formas promastigotas foram contadas em Câmara de Neubauer e ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%/pH=7,2-7,4) numa concentração final de 5×10^7 promastigotas. A dose do inóculo foi padronizada para 1000 μL . O inóculo foi realizado pela via endovenosa na veia radial esquerda dos animais.

A avaliação clínica detalhada dos animais após o desafio experimental foi realizada mensalmente por médico veterinário e os dados clínicos observados foram anotados em ficha clínica individual dos cães. As análises e classificação clínica dos animais foram segundo Mancianti *et al.* (1988) e Reis *et al.* (2006a).

E) Obtenção de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL, através de punção da veia jugular ou radial e transferidos 5mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados as análise de hemograma e imunofenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo. Subseqüentemente, 15mL foram transferidos para dois tubos, um com heparina sódica e outro sem anticoagulante. Os tubos sem anticoagulante foram imediatamente centrifugados a 450 x g por 15 minutos para obtenção das amostras de soro para avaliação do quadro bioquímico dos animais, além disso, foram aliquotadas e congeladas à - 80°C para posteriores avaliações sorológicas anti-*Leishmania* (EIE[®], DPP[®]). O sangue coletado e transferido para o tubo com o anticoagulante heparina sódica foram utilizados na cultura rápida de 12 horas para dosagem de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-4) em LT CD4⁺ e LT CD8⁺.

Para realização dos testes *in vitro* da avaliação da resposta imune, através da atividade linfoproliferativa e imunofenotipagem de cultura de 5 dias, 20 mL de sangue foram coletados em seringas descartáveis estéreis de 20 mL rinçadas com heparina.

5.3 - Metodologias aplicadas à análise de inocuidade e toxicidade vacinal

A) Avaliações comportamentais, fisiológicas e clínicas

As análises de inocuidade e toxicidade vacinal foram realizadas por médico veterinário durante um período de três dias após cada uma das três doses vacinais (24-72h T1, 24-72h T2, 24-72h T3). A repercussão sistêmica da inocuidade e toxicidade foi avaliada pelo acompanhamento da temperatura retal, peso corporal. As alterações macroscópicas no local das imunizações como dor, nódulos rígidos, nódulos ulcerados, inchaço ou edema foram avaliadas. Alterações clínico-toxicológicas do tipo: vômitos, diarreia, tremores e alterações comportamentais, também foram avaliados. Todas as alterações foram anotadas em fichas individuais.

B) Análise do perfil hematológico (Eritrograma e Leucograma)

Para a avaliação do perfil hematológico foi utilizada a técnica convencional de contagem de leucócitos (Dacie & Lewis, 1984), onde o sangue coletado em tubos de EDTA foi passado no aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) para a análise global de leucócitos(/mm³), número global de células vermelhas (10⁶/ mm³), hemoglobina(g/dL), hematócrito (%) e plaquetas (10³/ mm³). O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm³ e a contagem diferencial de células com determinação do número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov[®], Pinhais, PR, Brasil) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

C) Análise do perfil bioquímico em soro

Nos tempos previamente determinados (diagrama 1) foram realizadas coletas de sangue para obtenção do soro dos cães e realização das avaliações bioquímicas que consistiram das seguintes análises: dosagem de proteína total; dosagem de albumina; globulina; relação albumina/globulina; prova de função renal a partir da dosagem de uréia e creatinina; provas de função hepática, compreendendo a dosagem das enzimas alanina amino transferase (ALT/TGP), aspartato amino transferase (AST/TGO), gama glutamil transferase (gama-GT), fosfatase alcalina e bilirrubina total. Para a avaliação dos parâmetros foi utilizado o Sistema Bioquímico Automático (CELM SBA-200, Barueri, SP, Brasil) e empregado Kits comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo os métodos colorimétricos descrito pelo fabricante.

5.4 - Metodologias aplicadas à análise da imunogenicidade vacinal

A) Ensaio de imunofenotipagem celular - *ex vivo*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 1, e os mesmos foram diluídos em solução de PBS pH 7,2/20% SFB (FACS dil) em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo.

Em tubos cônicos de poliestireno de 5mL (Falcon[®] – BD) contendo 30μL dos anticorpos diluídos (ver Tabela 1), foram adicionados 30μL de sangue total coletado como descrito no item (5.2.E). As amostras de sangue periférico foram homogeneizadas

cuidadosamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3mL de solução de lise (FACS Lysing Solution – BD), sob agitação no vórtex. As suspensões celulares foram mantidas em repouso por 10 minutos a TA, ao abrigo da luz; após esse tempo as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por 7 minutos, TA. Após isso, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos e as células foram, então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3mL de PBS pH 7,2/10% SFB e as suspensões celulares submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, por 7 minutos, TA, sendo novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspendido e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram, então, fixadas com 200µL de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C ou até 24 horas, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo (vinte mil eventos) foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados foi empregado o software FlowJo® utilizando diferentes estratégias.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3 (1:10)	FITC	Camundongo	CA17.2A12	Linfócitos T maduros
Anti-CD5 (1:200)	RPE	Rato	YKIX322.3	Linfócitos T
Anti-CD4 (1:800)	RPE	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:200)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-Célula B (1:200)	RPE	Camundongo	CA2.1D6	Linfócitos B
Anti-CD16 (puro)	APC	Camundongo	3G8	Células NK
Anti-CD14 (1:320)	RPE-Cy5	Camundongo	TÜK4	Monócitos

* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela SEROTEC Ltd (Oxford -England).

B) Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo

- *ex vivo*

Os resultados referentes aos aspectos fenotípicos analisados em relação as populações e subpopulações de linfócitos foram obtidos através da frequência (%) de linfócitos T CD3⁺, de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, de linfócitos B, de células NK CD5⁻ CD16⁺ e frequência (%) de monócitos CD14⁺.

A análise da frequência de linfócitos T (CD3⁺) ou linfócitos B foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 1A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}, o percentual de linfócitos T CD3⁺ (Q1) ou linfócitos B (Q1), dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência CD3/FL1 versus FL4 (B) ou Células B/FL2 versus FL4 (C), como exemplificado na Figura 1.

A análise da frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 2A). Após a seleção da região (R1) contendo as células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low} de interesse, o percentual de subpopulações T CD3⁺CD4⁺ (Q2) e T CD3⁺CD8⁺(Q2), dentro da população selecionada (linfócitos), foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas Figuras 2B e 2C.

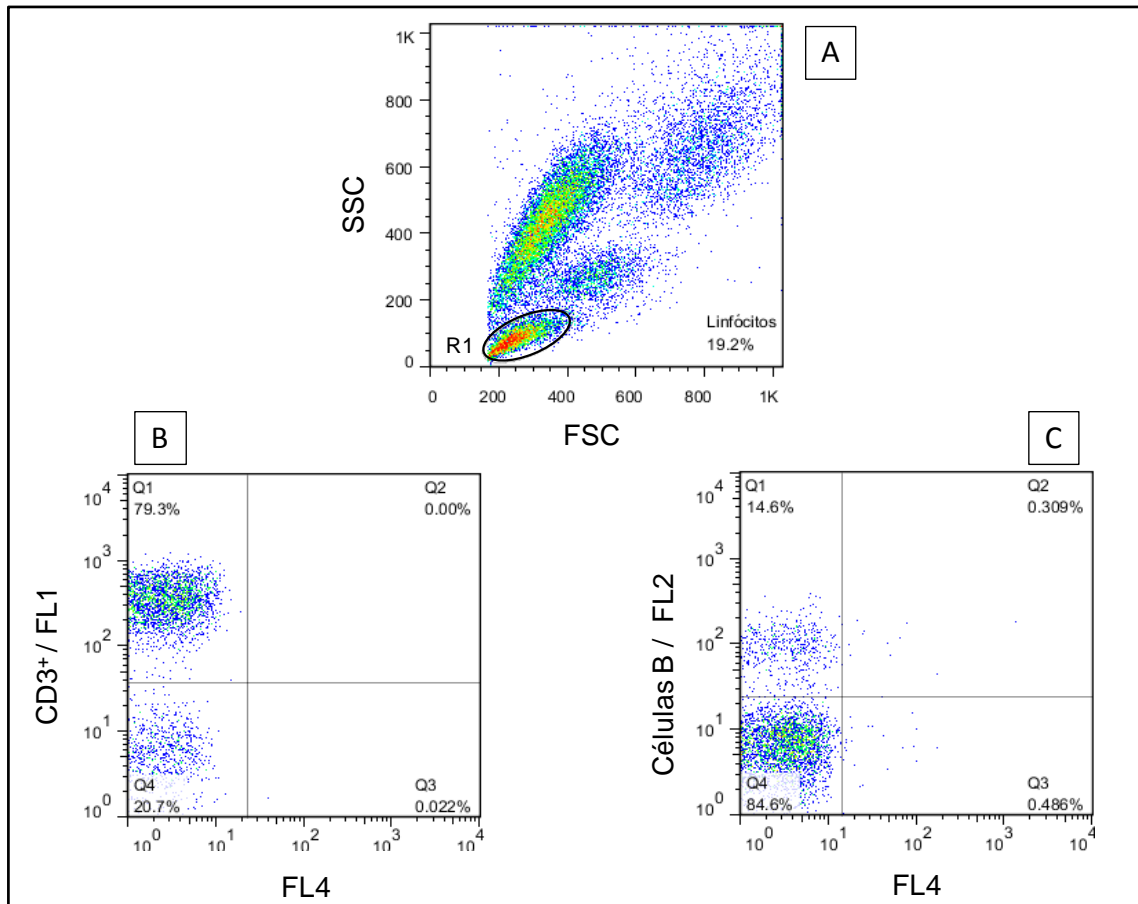


Figura 1 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de Linfócitos T CD3⁺ e Linfócitos B no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ (B: CD3⁺/FL1 versus FL4) e percentual das populações de linfócitos B (C: Células B/FL2 versus FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

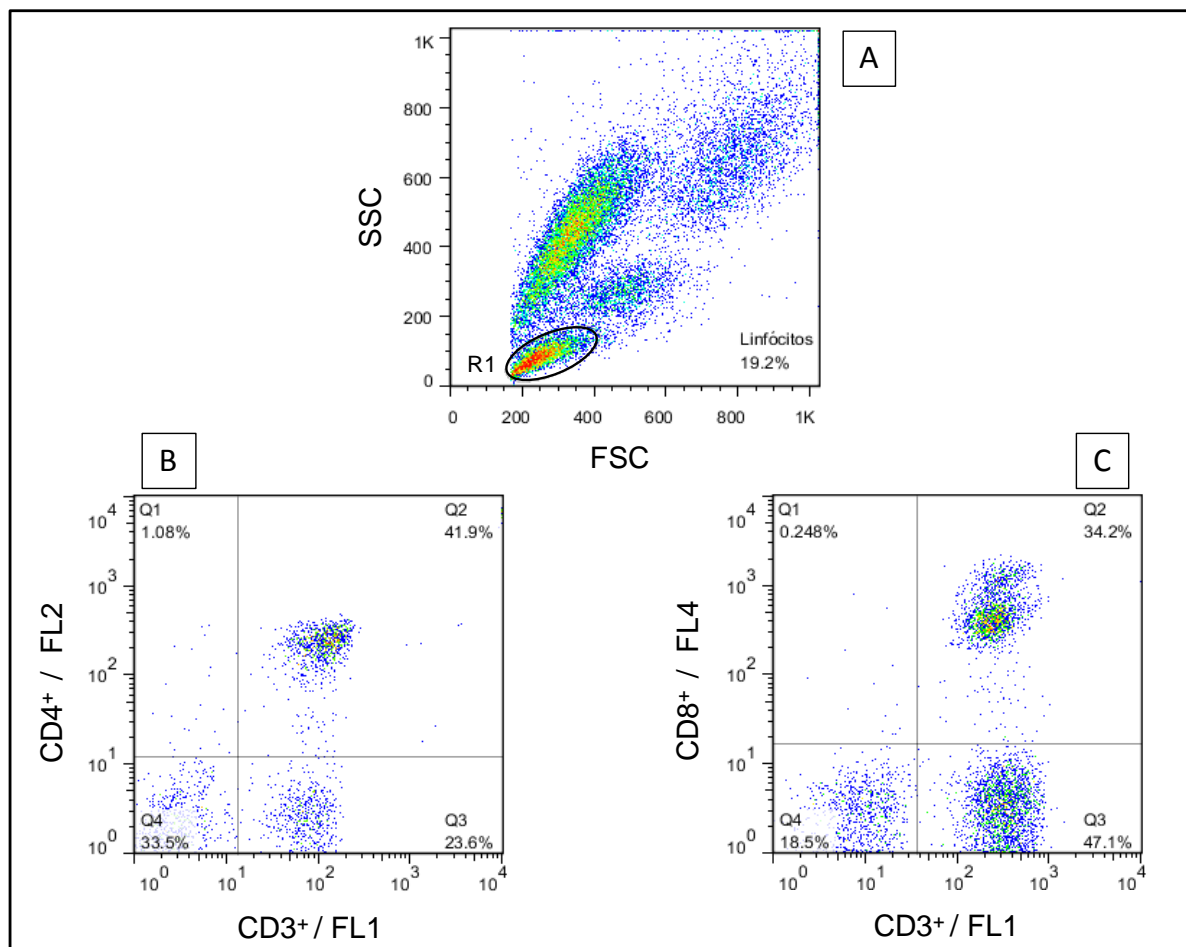


Figura 2 - Sequência da análise realizada para quantificar o percentual de Linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ (B: CD3⁺/FL1 versus CD4⁺/FL2) e percentual das populações de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ (C: CD3⁺/FL1 versus CD8⁺/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas freqüências (%) correspondentes a cada quadrante.

A análise da frequência de células NK CD5⁻CD16⁺ foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 3A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}, o percentual de células NK CD5⁻CD16⁺ (Q1), dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas Figuras 3B.

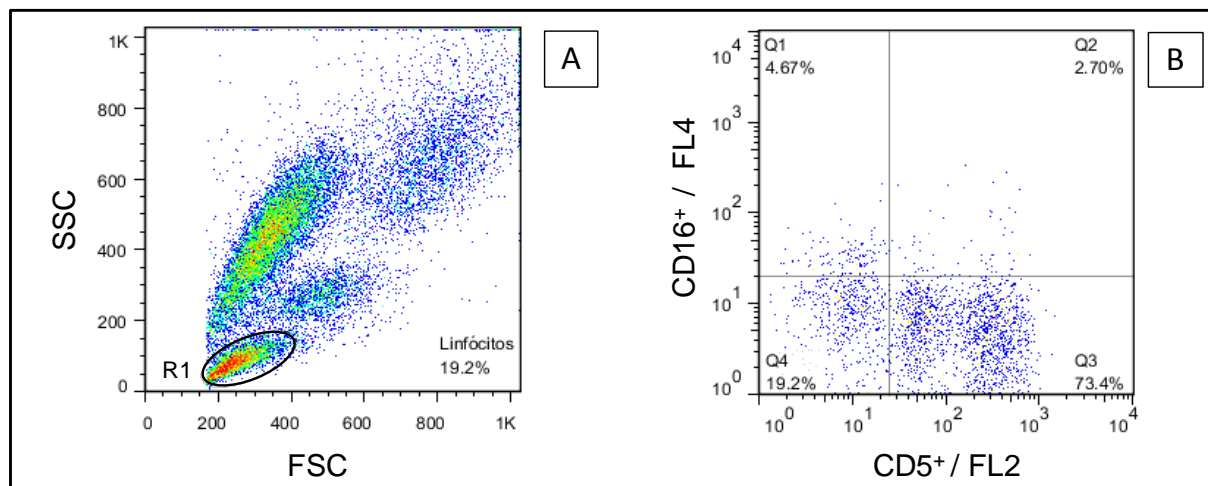


Figura 3 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de células NK CD5⁻ CD16⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de células NK CD5⁻CD16⁺ (B: CD5⁺/FL2 versus CD16⁺/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

A análise de monócitos CD14⁺ foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R2), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD14⁺/FL3 versus SSC, para a identificação da população de monócitos como células CD14^{High} SSC^{intermediário}, minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 4).

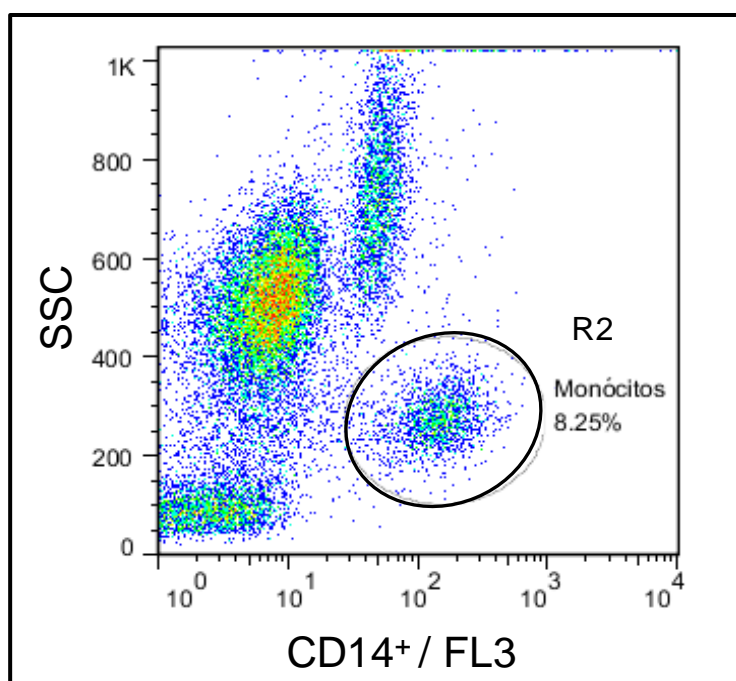


Figura 4-Sequência da análise realizada para quantificar o percentual de monócitos CD14⁺ no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R2, indicando o posicionamento da população de monócitos, bem como para quantificação do percentual total de monócitos.

C) Obtenção do antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) para os ensaios *in vitro*

Para os ensaios de cultivo celular (linfócitos produtores de citocinas, linfoproliferação e imunofenotipagem de linfócitos) foi utilizado antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) (MHOM/BR/1972/BH46). Após obtenção da massa de promastigotas (descrito item 5.2.A), os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente, a três ciclos de rompimento mecânico em homogeneizador elétrico com pistão de teflon (Virtis, Holanda) por 1 minuto com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o material antigênico foi centrifugado a 37.000 x g, durante 90 minutos à 4°C. Subsequente a ultra-centrifugação, o sobrenadante, contendo o antígeno solúvel, foi coletado e distribuído em sacos de diálise e dializado contra PBS 1X/pH 7,2 à 4°C, sob agitação por 72 horas. O material foi recolhido, filtrado em membrana de 0,22 µm, e uma alíquota foi separada para dosagem da concentração de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951). O material antigênico foi ressuspensão para uma concentração final protéica de 1 mg/mL. O material foi alíquotado e conservado em freezer à -80°C (Forma Scientific, EUA) até o momento do uso.

D) Ensaio *in vitro* de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho encontram-se descritos na Tabela 2. Os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram diluídos em solução de PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1% de azida sódica); já os anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-4, em solução de PBS-P (PBS-W contendo 0,5% de saponina - Sigma), em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo. Foram preparados inicialmente três tubos de polipropileno de 13 mL (Falcon®, Becton Dickinson, San Diego, EUA) para cada animal analisado, a saber: tubo controle (1,0mL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina) tubo estimulado com antígeno de *L. infantum* na concentração final de 25 µg/mL (250 µL de ASLi, 750 µL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina) e tubo contendo PMA (éster mirístico de forbol) como controle positivo da reação (inicialmente com 1,0mL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina). Os tubos foram incubados por 12 horas e

mantidos à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO₂. Após este período, os tubos PMA foram retirados e a eles adicionados 50µL de PMA (25ng/mL) e 2µL de ionomicina (1µg/mL). Posteriormente o restante dos tubos foram retirados da estufa e adicionados 20µL de brefeldina A (10µg/mL) em todos os tubos (inclusive nos tubos PMA), com posterior incubação por 4 horas. Os tubos foram mantidos à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO₂. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200µL ácido etilendiamino tetracético - EDTA (Sigma), concentração final de 2mM, e incubadas por 10 minutos à TA. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6,0 mL de PBS-W e centrifugadas por 7 minutos a 400 x g, a 18°C. O sobrenadante foi descartado restando no tubo um volume final de 2,0 mL (sobrenadante e *pellet*) sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Ao abrigo da luz, foi retirado 500µL do *pellet* e transferido para outros tubos de poliestireno, contendo os anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície CD4⁺ (diluição 1:400) e CD8⁺ (diluição 1:100). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz. Em seguida foi adicionado aos tubos, 3,0mL de solução de lise (Facs lysing solution - Becton Dickinson, San Jose, EUA) sob agitação em vórtex, e incubados por 10 minutos à TA e ao abrigo da luz e, posteriormente, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi então desprezado e o *pellet* homogeneizado em vórtex até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 500µL de PBS-W em cada tubo e estes foram homogeneizados. Em seguida, foi adicionado 3,0mL de PBS-P, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos à TA e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo homogeneizado até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 2,0mL de PBS-W com posterior agitação em vórtex. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado para 200µL. Após a ressuspensão das células em placas de 96 poços e fundo em “U”, prosseguiu-se com a marcação das citocinas intracitoplasmáticas.

Para marcação das citocinas, alíquotas de 30µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz na presença de 20µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE anti-IFN-γ (diluição 1:50) e anti-IL-4 (diluição 1:50) (Tabela 2). A placa foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à TA e ao abrigo da luz sendo, em seguida, adicionado 100µL/poço de PBS-P e a placa centrifugada por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o

pellet homogeneizado vagarosamente no vórtex. Posteriormente, foi adicionado 200µL/poço de PBS-W, centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* novamente homogeneizado. Em seguida, foi adicionado 200µL/poço de solução fixadora (MaxFacsFix) e este conteúdo transferido para microtubos de 500µL. Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), avaliando-se trinta mil eventos/tubo.

Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*.

Anticorpos	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	FITC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-IFN- γ bovino	RPE	Camundongo	CC302	Tipo 1
Anti-IL-4 bovino	RPE	Camundongo	CC303	Tipo 2

* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela SEROTEC Ltd (Oxford - England).

E) Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , IL-4) foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R3), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4⁺/FL1 versus SSC ou CD8⁺/FL1 versus SSC, para a identificação da população de linfócitos T CD4⁺ como células CD4^{High} SSC^{low}, bem como para identificação da população de linfócitos T CD8⁺ como células CD8^{High} SSC^{low}, minimizando assim a contaminação da região selecionada (R3) por monócitos e neutrófilos (Figura 5). Após a seleção da região de interesse (R3) contendo células de fenótipo CD4^{High} SSC^{low} ou CD8^{High} SSC^{low} foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4⁺/FL1 ou CD8⁺/FL1 versus IL-4⁺/FL2 ou IFN- γ ⁺/FL2, para determinar o percentual de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ positivos produtores das citocinas IL-4⁺ (R4) ou IFN- γ ⁺ (R5). Como exemplo, abaixo, está

demonstrada a sequência utilizada para análise em linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ e T CD4⁺IFN-γ⁺ em cultura estimulada com ASLi (Figura 5B e 5C); para análise de linfócitos T CD8⁺ foi empregada a mesma estratégia.

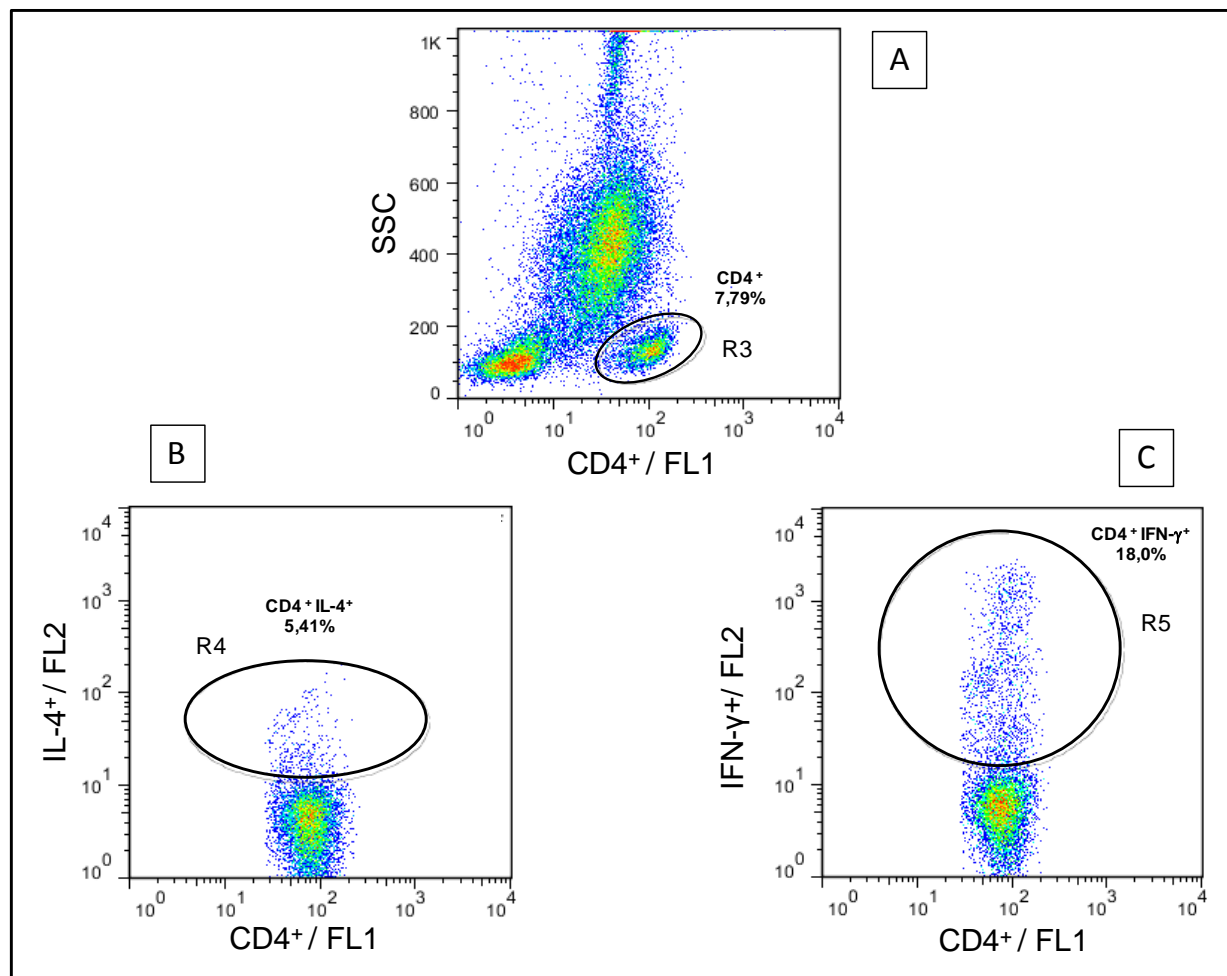


Figura 5- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ e T CD4⁺IFN-γ⁺ na cultura de sangue total em cães submetidos diferentes protocolos vacinais. (A) Gráficos de distribuição pontual de CD4⁺/FL1 versus SSC para a seleção da população celular de interesse – R3 com o fenótipo CD4^{High} SSC^{low}. (B) Gráfico de distribuição pontual CD4⁺/FL1 versus IL-4/FL2 contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ (R4) em cultura estimulada com ASLi (C) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4⁺/FL1 versus IFN-γ/FL2, contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IFN-γ⁺ (R5) em cultura estimulada com ASLi. Acima dos balões/regiões demarcadas em B (R4) e C (R5) estão demonstrados as frequências (%) correspondentes a cada região (R4) e (R5) dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

F) Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios *in vitro* de linfoproliferação e imunofenotipagem

As seringas heparinizadas de coleta do sangue destinadas aos ensaios de cultivo celular foram descontaminadas com álcool 70% e encaminhadas à capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), para dar início ao processamento do

material. Logo em seguida, os 20mL de sangue coletados foram aplicados lentamente sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15mL de Ficoll-hypaque (Histopaque® 1.119 - Sigma Co., E.U.A) e 15mL de Ficoll-hypaque (Histopaque® 1.077 - Sigma Co., E.U.A) gelado (4°C) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon®, Becton Dickinson, San Jose, EUA), os quais foram centrifugados a 450 x g por 60 minutos à TA. Após este procedimento, foi removido o anel celular contendo CMSP, com auxílio de pipeta Pasteur, e as células foram lavadas com RPMI 1640 heparinizado [30µL de heparina 5.000UI/mL (Heparin®, Cristália) para cada 100mL de RPMI] por duas vezes, seguido de uma lavagem final em RPMI 1640, ambas em centrifugação a 450 x g por 10 minutos à 4°C. Ao final, as células foram ressuspensas em 2 mL em RPMI 1640. Para a contagem, foi utilizada a câmara hematocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany). Para tanto, foram utilizados 10µL da suspensão celular diluídos em 190µL de solução de Azul de Trypan (Sigma Co., E.U.A) (diluição 1:20) para a realização da contagem de células mononucleares e da análise de viabilidade celular. O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e o fator de diluição. Assim, o volume final foi ajustado para conter 1×10^7 células/mL.

G) Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem

O ensaio de proliferação linfocitária foi realizado para cada cão utilizando culturas em placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA), na presença de antígeno solúvel de *L. infantum*, do mitógeno concanavalina-A (Con-A, Sigma Co., E.U.A) e na ausência de qualquer estímulo (cultura controle não estimulada). A imunofenotipagem de CMSP foi também realizada em placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA). Após ajuste da concentração celular para 1×10^7 células/mL, foi retirado 1mL da suspensão de células sendo adicionado 1mL de solução de CFSE à 5µM (Vybrant® CFDA SE *Cell tracer kit*, Invitrogen) sendo os tubos incubados no escuro por 10 minutos a TA. Após a incubação, foi acrescentado 2mL de RPMI 1640/10%SFB sendo homogeneizado e incubado por 10 minutos em banho de gelo ao abrigo de luz. A suspensão celular foi lavada por 3 vezes com meio RPMI 1640 sendo centrifugados a 400 x g por 7 minutos a 4°C e a seguir as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI 1640 para plaqueamento.

Foram utilizados 650 μL de meio para cultivo de células caninas CM-Blast (10% SFB, 1% de Estreptavidina/Penicilina, 2mM L-glutamina e 0,1% β -mercaptoetanol, em RPMI 1640) em cada um dos orifícios avaliados. Nestes orifícios, foram adicionados 50 μL da suspensão de linfócitos contendo 10^7 células/mL marcadas com CFSE, ou seja, 500.000 células/orifício nos poços que correspondem ao controle, ao mitógeno Con-A e na cultura com a presença do estímulo ASLi. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do estímulo ASLi diluídos em meio de RPMI 1640, na concentração final de 25 $\mu\text{g/mL}$. Do agente mitogênico Con-A, foram adicionados 100 μL da solução de uso diluída em RPMI 1640 nos respectivos orifícios da placa (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$), destinados à avaliação do controle de viabilidade funcional celular e da capacidade linfoproliferativa. Como controle de proliferação, as células também foram cultivadas na ausência de qualquer estímulo (antígenos ou Con-A). As células foram cultivadas por 5 dias, e mantidas à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO_2 .

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), através do programa *CELLQuest Pro* no quinto dia de cultivo. Após este período, as placas foram centrifugadas a 450 x g, em temperatura de 18°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para avaliação dos níveis de óxido nítrico e dosagens de citocinas sendo imediatamente congelados a -80°C. As células foram coletadas e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon® 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA) através de duas lavagens com 500 μL de PBS 1X/pH 7,2 gelado. Posteriormente, foi adicionado 100 μL de solução de EDTA (20mM) sendo incubado por 10 minutos a TA. A seguir, 3mL de PBS-W foram acrescentados em agitação no vórtex para posterior centrifugação a 450 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi vertido e os tubos secos delicadamente em papel toalha. Foi acrescentado 50 μL de PBS 1X/pH 7,2 sob agitação em vórtex e as células foram distribuídas em 2 tubos de poliestireno contendo 30 μL de anticorpos monoclonais anti-CD4 (diluição 1:400) e anti-CD8 (diluição 1:100) conforme tabela 3. Os tubos foram incubados por 30 minutos ao abrigo de luz à TA sendo posteriormente adicionados 2mL de PBS-W em vórtex e centrifugados a 450 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 200 μL /poço de solução fixadora (MaxFacsFix). Os tubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo.

Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular no contexto *in vitro* em CMSP cultivadas por 5 dias.

Anticorpos	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	APC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos

* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela SEROTEC Ltd (Oxford - England).

H) Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e imunofenotipagem das CMSP pós-cultivo

Após aquisição dos dados no citômetro de fluxo através do Software BD CellQuest Pro[®], foi utilizado o programa FlowJo[®] para análise dos mesmos sendo que a Figura 6 ilustra a estratégia de análise utilizada.

Primeiramente, gráficos de distribuição pontual foram construídos a partir da seleção da população celular de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 6A).

A análise da proliferação linfocitária, os eventos selecionados na região R1 foram representados em gráficos de distribuição pontual de CFSE/FL1 versus FL2 para a identificação da população de linfócitos totais proliferados através da região R2 (Figura 6B).

A análise da frequência de proliferação da subpopulação de linfócitos TCD4⁺ foi realizada através dos eventos selecionados na região R1, representados em gráficos de distribuição pontual de CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 para a identificação da população de linfócitos T CD4⁺ totais proliferados e não proliferados através da região R3 (Figura 6C). Em seguida, através dos eventos selecionados na região R3, uma região denominada R4 foi demarcada para a identificação exclusiva dos linfócitos T CD4⁺ proliferados, em gráficos de distribuição pontual de CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 (Figura 6D). A mesma estratégia também foi utilizada para quantificação do percentual de linfócitos T CD8⁺ nas culturas estimuladas com ASLi e culturas não estimuladas.

Os resultados foram expressos na forma de índice de proliferação, obtidos pela divisão entre o percentual de linfócitos que proliferaram/dividiram das culturas estimuladas por ASLi (CE), dividido pelo percentual de linfócitos que proliferaram/dividiram das culturas controles não estimuladas (CC). Para cálculo do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que proliferaram/dividiram foi utilizada a

mesma abordagem de índice de proliferação descrita anteriormente. Como controle positivo da proliferação foram utilizados os valores percentuais de linfócitos que proliferaram/dividiram nas culturas estimuladas com Con-A divididos pelo percentual de linfócitos que proliferaram/dividiram das culturas controles não estimuladas (dados não mostrados).

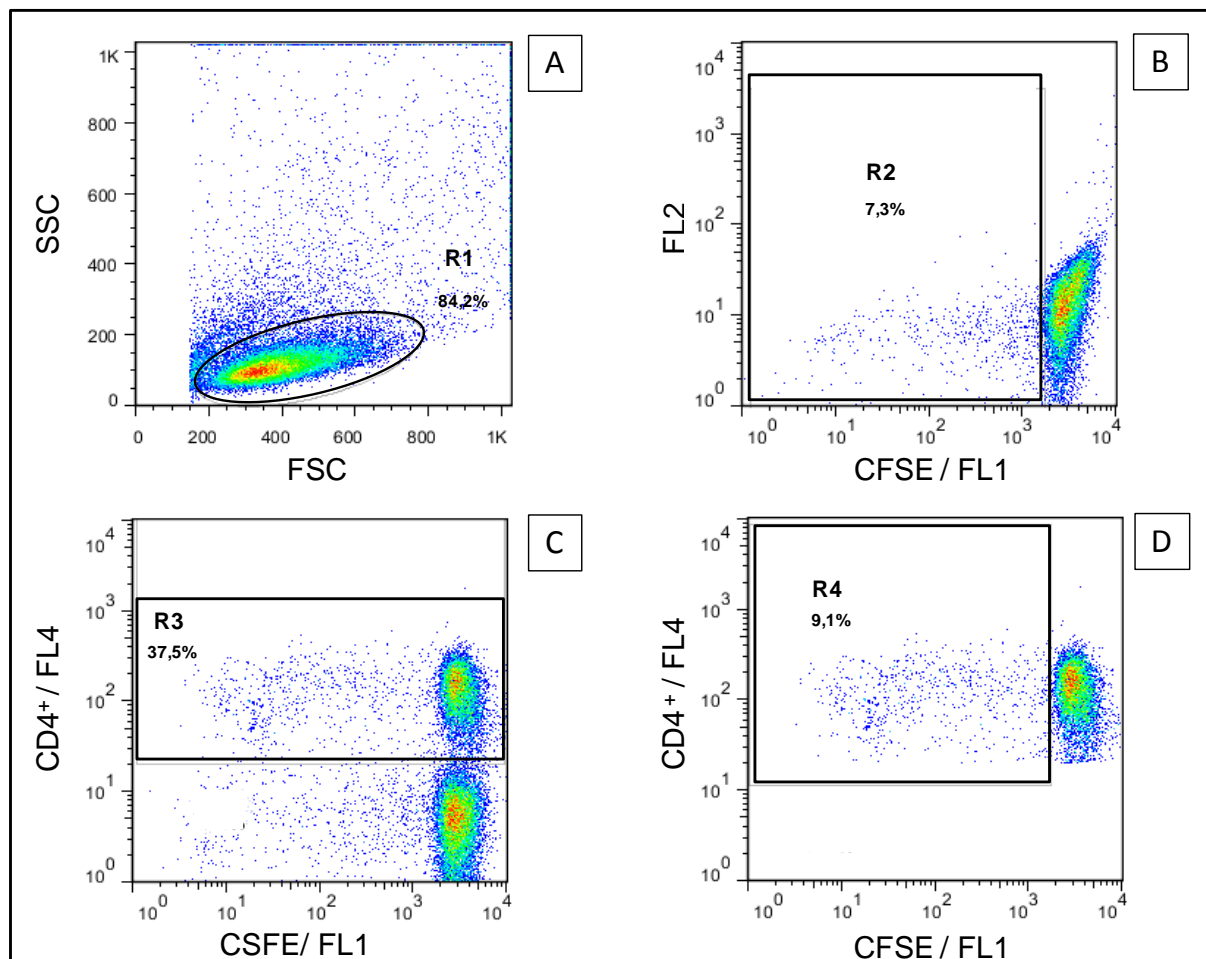


Figura 6 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4⁺ (C e D) na cultura de CMSP de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfoproliferação em cultura estimulada com ASLi. (C) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ totais (proliferados e não proliferados) (R3) em cultura estimulada com ASLi. (D) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4⁺/FL4 contendo as células selecionadas na região R3, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ proliferados (R4) em cultura estimulada com ASLi

I) Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*: teste imunocromatográfico rápido (RT DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e ensaio imunoenzimático (EIE[®]. – Bio-Manguinhos[®])

Amostras de soros dos diferentes grupos de cães foram submetidas ao teste imunocromatográfico rápido (DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e ao ensaio imunoenzimático (EIE[®]. – Bio-Manguinhos[®]), conforme recomendações do fabricante (Bio-Manguinhos[®]), sendo a técnica executada conforme descrição da bula dos dois testes diagnósticos. O ponto de corte discriminante negativo/positivo do ensaio imunoenzimático (EIE[®]. – Bio-Manguinhos[®]) foi determinado conforme recomendações da bula, sendo assim obtido pela média da densidade óptica dos controles negativos multiplicado por dois (x2). Assim, foram obtidos o ponto de corte discriminante negativo/positivo, avaliados por densidade óptica, para as reações realizadas pela análise comparativa entre os grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP11 (*Cut-off*: 0,164). A leitura das placas foi realizada em leitor automático de microplaca Multiskan[®] MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland), ajustando o comprimento de onda para 450 nm. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica de cada grupo nos tempos T0, T1 e T2.

5.5 - Metodologias aplicadas à análise da potência vacinal

A) Punções aspirativas de medula óssea e isolamento do parasito de *Leishmania*

Para a realização das punções aspirativas na medula óssea, os animais foram submetidos à anestesia geral prévia, utilizando como protocolo anestésico a combinação de cloridrato de xilazina (Calmium[®], Agener União, Brasil), como medicação pré-anestésica, na dose de 2mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular e cloridrato de quetamina (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil) na dose de 11mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, como anestésico geral. Após a obtenção do estado de anestesia geral, foi realizada a tricotomia e a anti-sepsia com solução de álcool iodado 2% (Rialcool[®], Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, Brasil) na região do esterno. A punção de medula foi realizada com agulha 18G (1,25mm x 38mm) (Nipro Agulha Hipodérmica, Nipro Medical, Brasil) acoplada em uma seringa de 10mL (BD Plastipak[®], Becton, Dickison and Company, EUA). Após ser introduzida no osso esterno até atingir o canal medular, foi realizada pressão negativa no êmbolo da seringa e coletado amostra de 1,0mL de conteúdo de medula óssea (Raskin & Beldner 1998).

Cerca de 0,75mL deste material foi transferido para um tubo autoclavado de microcentrífuga de 2mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) e utilizado para o diagnóstico parasitológico por meio de PCR em tempo real específica e aproximadamente 0,25mL foram transferidos para dois tubos (dois tubos por cão) contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT, próximo ao bico de Bunsen para evitar contaminação, afim de se isolar o parasito.

Os tubos destinados ao isolamento do parasito foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C e após 7 dias, foram feitas duas lâminas de cada tubo para avaliação em microscópio óptico afim de se identificar o parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubos e repassado para um novo tubo contendo 3 mL NNN/LIT e após 7 dias feita uma nova avaliação em microscópio óptico. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes sendo que ao final de três “repiques”, não sendo identificados parasitos, os tubos eram descartados.

B) Análise Molecular para quantificação da carga parasitária na medula óssea pela técnica de PCR em tempo real

B1 – Extração massa de promastigotas

Para extração do DNA genômico dos parasitos, foi utilizado o método do fenol-clorofórmio seguindo o seguinte procedimento: 1×10^8 parasitos estocados foram retirados do freezer -80°C, e após o descongelamento, foram ressuspensos em solução de lise (SDS 1%, 50mM EDTA, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0) com adição de 50 µl de proteinase K (20 mg/ml). Os tubos foram incubados em banho-maria a 55°C por 3 horas. Após este período, foi adicionado igual volume de solução fenol/clorofórmio (5:1) homogeneizando por inversão dos tubos durante 10 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 16.000 rpm. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e repetiu-se o processo.

A esta nova fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por inversão durante 10 minutos e centrifugados por 10 minutos a 16.000 rpm. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 2 volumes de etanol a 100% (Merck®, Darmstad, USA) gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e incubou-se a -20°C por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 16.000 rpm com descarte do sobrenadante. Logo

depois, foram adicionados 200 µl de etanol 70 % (Merck[®], Darmstad, Alemanha), centrifugou-se a 16.000 por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo com o etanol 70 % (Merck[®], Darmstad, Alemanha). Com o descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão com adição de 100 µl de água bi-distilada, em seguida, os tubos fechados foram deixados a temperatura ambiente para um período *overnight* de hidratação. Após esse período, cinco (5) microlitros foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus[®], GE Healthcare, USA), então descartados. Os noventa e cinco (95) microlitros remanescentes foram estocados em a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

B.2 - Extração do DNA das amostras de medula óssea

Nas extrações de DNA dos tecidos foi utilizado o *kit* Wizard[™] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) conforme manual do fabricante e brevemente será descrito a seguir: 100 µL do aspirado medular foi colocado dentro do tubo eppendorf de 0,5 mL. Neste mesmo tubo foi colocado 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e adicionado 600 µL da solução de lise nuclear. Em seguida, foi incubado em banho Maria a 55°C *overnight* para a total digestão dos tecidos. Após a incubação, em cada tubo foi adicionado 3 µL de solução contendo RNase. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas levemente por 10x invertendo o tubo e incubadas por 30 minutos a 37° C. Posteriormente, aos tubos foram adicionados 200 µL da solução de precipitação protéica, foram passados no vórtex (Vision Scientific, Korea) em baixa velocidade por 10 segundos, colocados no gelo, incubados por 5 minutos e centrifugados a 16000 x g (Microcentrífuga Eppendorf[®] - Modelo 5418, NY, USA) por 4 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo novo de 1,5 mL utilizando ponteira de barreira (com a ponta cortada) e o tubo com o *pellet* residual foi descartado. A este novo tubo foram adicionados 600µL de isopropanol (Merck[®], Darmstad, Alemanha), com homogeneização dos tubos por inversão (10 vezes) e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi adicionado ao *pellet* residual 600µL de etanol 70% (Merck[®], Darmstad, Alemanha), procedendo-se a homogeneização por inversão do tubo (10 vezes). Após, os tubos serem centrifugados a 16000 x g por 5 minutos, o sobrenadante

foi descartado. Foram adicionados 600 μL de etanol 70% (Merck[®], Darmstad, Alemanha), os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 5 minutos. Com o descarte do sobrenadante, os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão com adição de 100 μL de água bi-destilada, em seguida, os tubos fechados foram deixados à temperatura ambiente para um período *overnight* de hidratação. Após esse período, dez (10) microlitros foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus[®], GE Healthcare, USA), então descartados. Os noventa microlitros remanescentes foram estocados em a -20°C até a sua utilização. Somente a amostra de DNA que teve densidade óptica (DO) na razão 260/280 de 1,7-2,0 e uma DO na razão 260/230 maior que 2,0 foram tomadas para os experimentos de PCR em tempo real.

B.3 - Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

Para construção da curva padrão, foi utilizada uma massa de cultura de promastigotas contendo 10^8 parasitos, previamente, contada utilizando câmara de Neubauer. Após a contagem foi realizada a extração (método de fenol-clorofórmio – descrito no B.1) da massa de cultura de promastigotas. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100 μL de água bi-destilada, a concentração foi de 10^6 parasitos/ μL , assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram mensuradas em nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus[®], GE Healthcare, USA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm. A partir daí, foram feitas diluições de forma seriada de 10X, com obtenção de sete pontos na curva de 10^6 a 1 parasitos.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp[®]Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP.

Os controles positivos de cada placa foram às amostras diluídas de *Leishmania infantum* utilizadas na curva padrão; e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com

as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15segundos e 60°C por 1minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina é elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10ng/μL); iniciadores (5pmol/μL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10μL por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (Ct), calculada pelo programa *7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L.infantum* da curva padrão.

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação do gene de GAPDH, que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os iniciadores direto: 5' TTCCACGGCACAGTCAAG 3' e reverso: 5' ACTCAGCACCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de kDNA *Leishmania* spp. Foram utilizados os iniciadores direto: 5' CTCCGGGTAGGGGCGTTC 3' e reverso: 5' GCCCTATTTTACACCAACCCC 3', que amplificam um fragmento de 122pb (acesso no GenBank: AF103738). As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10ng/μL); iniciador (5 pmol/μL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10μL por poço. Após a amplificação e obtenção do número de cópias de DNA de GAPDH de cada amostra, o menor valor obtido de Ct foi selecionado e os demais valores foram divididos por esse número. Os resultados desta razão constituíram os fatores de correção individual, que posteriormente foram multiplicados pelo número de cópias de DNA de *Leishmania* obtido para a respectiva amostra, determinando assim a carga parasitária (expressa em número de amastigotas por amostra).

Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$). Segue abaixo como exemplo, a curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania spp.* utilizada neste estudo (Figura 7).

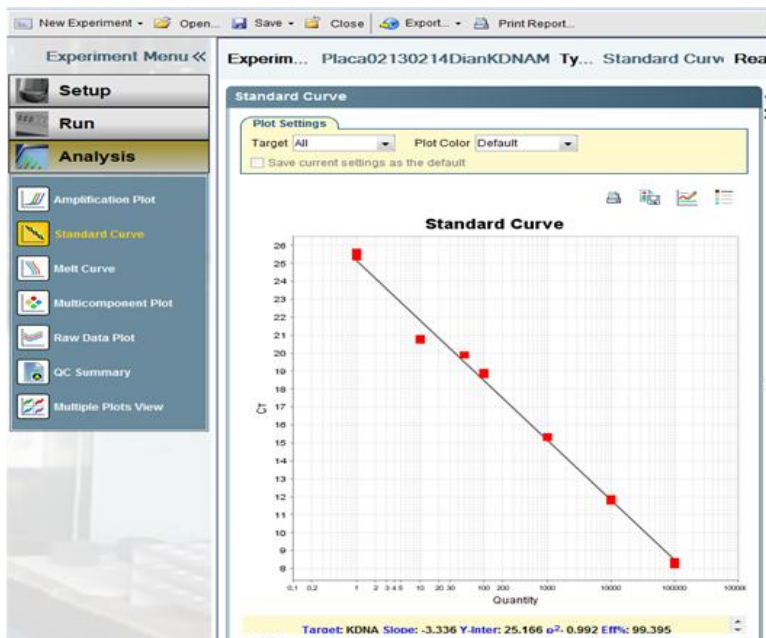


Figura7: Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania spp.* Em X estão demonstrados os valores de *Log* da concentração de parasitos (10^6 a 10^0) e em Y os valores de *Ct* correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,32), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,999$) e a eficiência (100%).

Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas para um mililitro de medula óssea (amastigotas/mL).

5.6 - Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). De acordo com os resultados obtidos nas avaliações clínico-laboratoriais e parasitológicas foram avaliadas diferenças dentro de cada grupo e entre os diferentes grupos experimentais nos três tempos avaliados. As variáveis laboratoriais (parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos) avaliadas neste estudo apresentaram distribuição normal, verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, e, portanto, foram analisadas pelos testes paramétricos. Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) com medidas repetitivas seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey* para determinar as diferenças específicas de cada grupo ao longo dos diferentes tempos avaliados. O Teste t não-pareado foi

utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos no mesmo tempo avaliado.

Já os resultados das análises parasitológicas não apresentaram uma distribuição normal, e foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado na comparação entre os diferentes grupos no tempo da avaliação parasitológica (T2).

Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi $<0,05$. Toda a análise estatística dos dados deste estudo foi definida e avaliada com o acompanhamento de um analista estatístico.

6. Resultados

Apresentação dos resultados

O presente trabalho traz como resultados um conjunto de dados que poderá orientar futuras pesquisas no campo da imunoprofilaxia da LVC, tais como: avaliações de toxicidade/inocuidade, imunogenicidade, seleção de potenciais antígenos e estratégias vacinais. Para facilitar o entendimento dos dados gerados no presente estudo, os resultados serão descritos em três partes. Inicialmente serão descritos os resultados relacionados à avaliação de aspectos ligados inocuidade e toxicidade pós-vacinal, considerando todos os imunobiológicos avaliados neste estudo. Na segunda parte, serão descritos os resultados da imunogenicidade abordando a análise comparativa entre o grupo controle (C), grupo imunizado como protótipo vacinal LBSap (LBSap), grupo imunizado com a vacina comercial Leishmune[®] (Leishmune), grupo imunizado com a vacina comercial Leish-Tec[®] (Leish-Tec), grupo imunizado como protótipo vacinal KMP-11(KMP-11). Na terceira parte, serão descritos os resultados da potência vacinal de todos os imunobiológicos avaliados neste estudo após a infecção experimental.

6.1 - Inocuidade e Toxicidade vacinal

A) Acompanhamento clínico de cães controle e submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais.

Em todas as observações clínicas realizadas após cada dose dos diferentes protocolos de imunizações vacinais não foram detectadas alterações toxicológicas, como por exemplo: vômitos, diarreia, tremores e alterações comportamentais.

Os grupos Controle e Leish-Tec não apresentaram qualquer tipo de alteração macroscópica no local do inóculo vacinal, durante ou após as três doses vacinais (Tabela 4). Já os grupos LBSap, Leishmune e KMP-11 tiveram em pelo menos um animal por grupo alterações após cada uma das doses vacinais. O número de cães com algum tipo de alteração no local do inóculo vacinal aumentou após a terceira dose [LBSap (7/7), Leishmune (5/6), e KMP-11 (6/7)]. As principais alterações observadas, na maioria das vezes foram: nódulos pequenos, não ulcerados, de consistência firme, com dimensões variáveis (0,1 a 1cm²) quase imperceptíveis e que desapareciam após 72horas. Também foi observado edema no local do inóculo (inchaço local que cedia a compressão digital), classificado como leve, uma vez que atingiu extensão inferior a 3 cm, que deixaram de ser perceptíveis após 72 horas da vacinação. Neste sentido, alguns

cães imunizados com LBSap, Leishmune e KMP-11 apresentaram alterações ora de edema leve, ora de nódulos pontuais no local do inóculo (Tabela 4). Não foi observada queda de pêlo no local do inóculo vacinal em nenhum dos cães dos diferentes grupos vacinais.

No nódulo ou edema formado foi avaliada a presença ou ausência de dor no local do inóculo. Não era comum observar dor durante o momento da inoculação nas quatro vacinas estudadas. Entretanto, apenas um cão em cada um dos grupos vacinais LBSap, KMP-11 e Leishmune, após a terceira dose vacinal apresentaram dor á palpação no local de inoculação das vacinas. Após 72 horas da vacinação os cães não apresentavam mais nenhuma dor local (Tabela 4).

B) Alterações fisiológicas: Medidas de temperatura retal (°C) e peso corporal (Kg).

Os resultados relacionados à avaliação da temperatura retal dos diferentes grupos de cães estão apresentados na Tabela 4. Os dados mostram a quantidade de animais que apresentaram febre no mesmo grupo (razão: número de animais com febre / número total de animais). As medidas da temperatura retal foram aferidas após 24, 48 e 72 horas de cada uma das três doses vacinais. A maioria dos cães dos diferentes grupos avaliados mantiveram temperatura corporal dentro da faixa considerada como normal (até 39,5°C) para cães. Embora tenha sido observado aumento da temperatura retal (temperatura >39,5°C) de forma individual e esporádica em alguns animais nos grupos LBSap, Leishmune e KMP-11 nos diferentes tempos avaliados, nenhum destes animais apresentou o estado fisiológico febril (temperatura >39,5°C) após 72h do inóculo vacinal, sendo importante relatar que em nenhum cão a temperatura retal ultrapassou 41 °C.

Nenhum dos cães nos diferentes grupos experimentais, em nenhum dos tempos avaliados: até 72 horas após primeira dose vacinal, até 72 horas após segunda dose vacinal, até 72 horas após terceira dose vacinal, apresentaram variações acima de um quilo (1Kg) em seus pesos corporais. É importante relatar que os animais utilizados nos experimentos são cães sem raça definida, de idade adulta (faixa etária média de dois anos), e pesavam em média quinze quilos.

Tabela 4: Avaliação da Inocuidade e Toxicidade em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais

Grupos	Tempos	Perda peso corporal	Febre	Edema/Nódulo	Dor Local
<i>24-72h após 1ªdose</i>					
Controle		-	-	-	-
LBSap		-	1/7	3/7	-
Leishmune		-	-	2/7	-
Leish-Tec		-	-	-	-
KMP-11		-	2/7	3/7	-
<i>24-72h após 2ªdose</i>					
Control		-	-	-	-
LBSap		-	3/7	2/7	-
Leishmune		-	2/7	2/7	-
Leish-Tec		-	-	-	-
KMP-11		-	3/7	3/7	1/7
<i>24-72h após 3ªdose</i>					
Controle		-	-	-	-
LBSap		-	4/7	7/7	1/7
Leishmune		-	-	5/7	1/7
Leish-Tec		-	-	-	-
KMP-11		-	1/7	6/7	1/7

Proporção do número de cães em cada um dos grupos vacinais que apresentaram alguma das alterações fisiológicas e/ou comportamentais avaliadas como: Emagrecimento; Febre (temperatura retal acima de 39,5°C); alterações no local das imunizações (nódulo ou edema; Dor local); ao longo de 72 horas após cada uma das três imunizações vacinais respectivas aos grupos: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune; vacina Leish-Tec; Vacina recombinante KMP-11; Tempos de avaliação: 24-72h 1ªdose = vinte quatro a setenta e duas horas após a primeira dose de imunização; 24-72h 2ªdose = vinte quatro a setenta e duas horas após a segunda dose de imunização; 24-72h 3ªdose = vinte quatro a setenta e duas horas após a terceira dose de imunização;

C) Avaliação do perfil hematológico de cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais antes e após o desafio experimental

A análise do hemograma (leucograma e eritrograma) é um dos principais parâmetros alterados em resposta à toxicidade vacinal em nível sistêmico, pois a vacinação pode repercutir na celularidade e hemostasia sanguínea. Além disso, a análise do hemograma (leucograma e eritrograma) é um dos principais parâmetros avaliados para prognóstico e progressão da gravidade da LV.

Nesse sentido, com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros hematológicos dos cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais proposto neste estudo, foram avaliados 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses, afim de estabelecer valores de referência para o leucograma e eritrograma (Tabela 5). Dessa maneira, foi possível avaliar antes (T0) e após os protocolos vacinais (T1), bem como após seis meses do desafio experimental (T2) os parâmetros hematológicos dos animais em comparação com a faixa de valores

de referência ou valores normais estabelecida em nosso laboratório para cães sem raça definida (SRD).

Os valores referentes ao perfil hematológico do leucograma: valores absolutos das populações de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos bem como da população global de leucócitos (células/mm³), dos animais antes (T0) e após os diferentes protocolos de imunizações vacinais (T1) bem como após o desafio experimental (T2) encontram-se apresentados na Tabela 5.

Ao avaliarmos a contagem global de leucócitos no grupo LBSap observamos aumento com relação ao grupo controle em T1, sendo que o aumento em T1 foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a contagem do valor absoluto da global de leucócitos do mesmo grupo em T0. O grupo KMP-11 também apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) da contagem global de leucócitos em T1 em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) também foram encontradas ao avaliarmos a população de neutrófilos no grupo LBSap em comparação ao grupo controle no tempo T1, sendo o valor absoluto de neutrófilos em T1 maior que T0. De forma semelhante, o grupo KMP-11 apresentou aumento ($p < 0,05$) na população de neutrófilos em T1 quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

Não foram observadas alterações significativas em relação aos valores do leucograma (leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos) em T2 (seis meses após o desafio experimental) entre os diferentes grupos, bem como, entre estes valores no T2 comparativamente com os demais tempos (T0 e T1). Entretanto, em T2 no grupo controle foi possível evidenciar cães com valores da população global de leucócitos e neutrófilos totais abaixo dos valores de referência (Tabela 5).

Em relação ao eritrograma, não foi observado nenhuma diferença entre os valores da contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas entre os diferentes grupos nos tempos T0, T1 e T2 bem como comparativamente entre os tempos (Tabela 6). Entretanto, em T2 no grupo Leish-Tec foi possível evidenciar cães com valores da população de plaquetas abaixo dos valores de referência (Tabela 6).

Tabela 5: Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental

Grupos	Tempos	Global Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos Totais	Eosinófilos
Valores de Referência		7408 – 14440 (mm ³)	2299 – 5119 (mm ³)	147 – 601 (mm ³)	3839 – 9379 (mm ³)	150 – 710 (mm ³)
<i>T0</i>						
Controle ^(a)		10660±777	3359±242	323±136	6191±1344	424±196
LBSap ^(b)		10414±1389 ^{T1}	3537±564	354±125	6158±1132 ^{T1}	230±221
Leishmune ^(c)		12020±2367	3691±704	376±151	7160±1844	493±336
Leish-Tec ^(d)		11625±850	3961±710	445±200	7035±1511	467±387
KMP-11 ^(e)		11114±1913	3264±640	389±144	7134±1437	265±85
<i>T1</i>						
Controle ^(a)		10057±1756	3320±676	358±64	5974±1228	516±237
LBSap ^(b)		12371±1699 ^a	3003±351	364±82	8559±1963 ^a	445±292
Leishmune ^(c)		12533±2386	3336±794	366±218	7714±2212	806±343
Leish-Tec ^(d)		12150±2545	3467±853	330±54	7768±1721	585±351
KMP-11 ^(e)		13100±2701 ^a	3451±676	356±201	8779±2566 ^a	515±256
<i>T2</i>						
Controle ^(a)		9786±2266	3782±791	319±122	5282±1498	403±176
LBSap ^(b)		10629±2002	3735±781	337±130	6219±1390	338±136
Leishmune ^(c)		10983±902	3688±1011	322±155	6491±1361	482±343
Leish-Tec ^(d)		12617±3439	4307±1195	425±226	7337±2259	549±727
KMP-11 ^(e)		11929±1785	3624±415	358±153	7519±1512	428±230

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do leucograma de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune (LM); vacina Leish-Tec(LT) ; Vacina recombinante KMP-11 (KM); Tempos de avaliação: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 6º mês após o desafio experimental; As diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, relacionadas aos grupos C, LBSap, LM, LT, KM, respectivamente. As diferenças significativas ($P<0,05$) da avaliação longitudinal de cada parâmetro do leucograma estão representadas pelas siglas T0, T1, T2, relacionadas aos tempos de antes da 1º imunização, 15 dias após a 3º imunização, seis meses após o desafio experimental, respectivamente; Em vermelho se encontram os grupos que apresentaram cães com valores absolutos do leucograma abaixo dos valores de referência.

Tabela 6: Eritrograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental

Grupos	Tempos	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	Plaquetas
Valores Referência		5,42 – 8,38 (10 ⁶ /mm ³)	13,2 – 21,2 (g/dL)	33,7 – 57,3 (%)	171 – 384 (10 ³ /mm ³)
<i>T0</i>					
Controle^(a)		7,20±0,69	17,9±2,1	50,2±5,5	282±71
LBSap^(b)		6,81±0,58	17,5±1,5	44,4±6,5	268±74
Leishmune^(c)		7,25±1,06	18,4±2,1	46,7±6,4	245±108
Leish-Tec^(d)		7,22±0,32	18,3±1,1	48,6±4,7	237±37
KMP-11^(e)		7,04±0,64	18,0±1,1	47,5±4,1	252±56
<i>T1</i>					
Controle^(a)		7,15±0,63	18,4±2,3	44,9±5,2	296±63
LBSap^(b)		7,13±0,76	18,4±2,1	44,9±5,1	306±93
Leishmune^(c)		7,77±0,67	19,7±1,4	48,5±4,0	287±46
Leish-Tec^(d)		7,16±0,40	18,4±1,0	44,5±3,4	344±31
KMP-11^(e)		6,98±0,88	17,5±2,5	43,6±6,0	319±99
<i>T2</i>					
Controle^(a)		6,89±0,73	16,2±1,8	41,5±3,2	276±84
LBSap^(b)		7,00±0,59	16,9±1,2	42,7±2,6	231±68
Leishmune^(c)		7,35±0,79	17,4±1,5	44,7±2,8	260±94
Leish-Tec^(d)		7,40±0,55	17,4±1,5	44,2±3,2	177±85
KMP-11^(e)		7,13±0,50	17,0±1,0	43,8±4,2	260±86

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do eritrograma (global de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune (LM); vacina Leish-Tec(LT) ; Vacina recombinante KMP-11 (KM); Tempos de avaliação: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 6º mês após o desafio experimental; Em vermelho se encontram os grupos que apresentaram cães com valores do eritrograma abaixo dos valores de referência.

D) Avaliação do quadro bioquímico de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental.

A função renal é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da resposta individual dos cães frente às vacinações subsequentes e definição da segurança vacinal. A avaliação da função hepática e o proteinograma são parâmetros utilizados para verificar se há comprometimento hepático durante e após o protocolo vacinal bem como para a avaliação da toxicidade das dosagens vacinais e períodos de imunização. Além disso, a função renal, hepática e proteinograma são parâmetros utilizados na definição de prognóstico de evolução da doença.

Nesse sentido, com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros bioquímicos dos cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações vacinais proposto neste estudo, foram avaliados 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses, a fim de estabelecer valores de referência para a função renal, hepática e proteinograma (Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente). Dessa maneira, foi possível avaliar antes (T0) e após os protocolos vacinais (T1), bem como após seis meses do desafio experimental (T2) os parâmetros bioquímicos dos animais em comparação com a faixa de valores de referência ou valores normais estabelecida em nosso laboratório para cães sem raça definida (SRD).

D.1 - Provas de função renal

Em relação à avaliação da função renal, foi observado antes e após o término dos protocolos de imunizações vacinais que os animais apresentaram valores séricos de uréia e creatinina dentro dos padrões de normalidade (valores de referência) para cães (Tabela 7).

Em relação à avaliação da função renal seis meses após o desafio experimental (T2), foi observado que alguns cães dos grupos LBSap e Leishmune apresentaram valores de uréia muito próximos do limiar máximo de aceitação para este biomarcador e que estes valores estavam acima da faixa de referência (Tabela 7). Neste mesmo tempo de avaliação (T2), com relação à creatinina, não foi observada alteração dos valores séricos quando comparado aos valores de referência para nenhum dos grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Análises bioquímicas da função renal de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental

Grupos	Tempos	Uréia	Creatinina
Valores de Referência		28,0 - 40,1 (mg/dL)	0,6 – 1,5 (mg/dL)
<i>T0</i>			
Controle ^(a)		35,6±1,0	1,2±0,3
LBSap ^(b)		36,2±1,0	1,2±0,2
Leishmune ^(c)		36,7±1,5	1,0±0,1
Leish-Tec ^(d)		36,9±1,5	1,1±0,2
KMP-11 ^(e)		36,2±1,3	1,2±0,2
<i>T1</i>			
Controle ^(a)		29,5±1,6	1,1±0,1
LBSap ^(b)		32,1±3,1	1,0±0,1
Leishmune ^(c)		30,9±5,9	1,0±0,1
Leish-Tec ^(d)		30,1±1,5	1,0±0,1
KMP-11 ^(e)		31,9±4,1	0,9±0,4
<i>T2</i>			
Controle ^(a)		34,9±5,8	1,1±0,2
LBSap ^(b)		39,4±6,0	1,1±0,1
Leishmune ^(c)		37,0±8,6	1,1±0,2
Leish-Tec ^(d)		30,6±6,1	0,9±0,1
KMP-11 ^(e)		34,7±5,6	1,2±0,2

Valores absolutos (média ± desvio padrão) da função renal (uréia e creatinina) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune (LM); vacina Leish-Tec (LT); Vacina recombinante KMP-11 (KM); Tempos de avaliação: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 6° mês após o desafio experimental; Em vermelho estão representados os valores da média dos grupos que apresentaram cães com dosagens acima dos valores de referência.

D.2 - Provas de função hepática

Em relação à avaliação da função hepática, foi observado antes e após o término dos protocolos de imunizações vacinais que os animais apresentaram valores séricos de AST/TGO, ALT/TGP, gama-GT, bilirrubina total, fosfatase alcalina dentro dos padrões de normalidade (valores de referência) para cães (Tabela 8).

Em relação à avaliação da função hepática seis meses após o desafio experimental (T2), não foram observadas alterações séricas para Gama-GT e bilirrubina total em nenhum dos grupos avaliados. Entretanto, cães dos grupos controle e Leish-Tec apresentaram valores de AST e ALT acima da faixa de referência (Tabela 8).

Na avaliação dos níveis séricos de fosfatase alcalina em T2, foram observados cães nos grupos Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 com valores acima da normalidade (valores de referência) (Tabela 8).

Tabela 8: Análises bioquímicas da função hepática de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental

Grupos	Tempos	TGO/AST	TGP/ALT	Gama-GT	Fosfatase Alcalina	Bilirrubina Total
Valores de Referência		26,1 - 48,1 (U/L)	31,2 - 63,2 (U/L)	0,6 -7,8 (U/L)	11,8 - 51,0 (U/L)	0,05 – 0,69 (mg/dL)
<i>T0</i>						
Controle^(a)		38,7±5,6	49,4±5,9	3,7±1,9	28,0±9,9	0,42±0,17
LBSap^(b)		34,7±5,8	45,3±6,3	4,9±1,8	28,6±8,2	0,44±0,13
Leishmune^(c)		37,4±3,4	48,4±8,8	4,8±2,1	24,3±5,7	0,49±0,15
Leish-Tec^(d)		38,2±5,1	49,0±10,6	5,1±1,6	32,0±9,5	0,28±0,08
KMP-11^(e)		35,8±5,6	47,7±11,0	5,0±2,9	33,4±11,1	0,32±0,16
<i>T1</i>						
Controle^(a)		38,3±4,1	44,0±10,1	5,9±0,9	36,0±8,2	0,27±0,16
LBSap^(b)		38,0±4,1	44,3±10,2	6,0±1,7	42,3±5,2	0,26±0,14
Leishmune^(c)		41,0±4,9	52,2±11,2	6,8±1,3	36,8±6,8	0,39±0,21
Leish-Tec^(d)		40,1±4,6	49,8±7,5	4,5±2,4	30,0±5,4	0,29±0,18
KMP-11^(e)		46,8±9,7	42,0±3,8	6,7±1,5	50,0±1,7	0,26±0,15
<i>T2</i>						
Controle^(a)		50,4±21,8	69,1±27,0	4,6±2,1	36,9±11,6	0,25±0,13
LBSap^(b)		39,4±3,4	44,0±9,0	2,7±2,3	39,2±11,5	0,35±0,24
Leishmune^(c)		37,3±6,8	42,7±14,3	3,8±2,3	45,5±15,9	0,36±0,11
Leish-Tec^(d)		42,7±9,0	63,2±44,2	3,8±2,2	40,6±21,9	0,25±0,12
KMP-11^(e)		39,1±7,2	48,4±9,1	5,4±1,3	47,1±16,1	0,27±0,18

Valores absolutos (média ± desvio padrão) da função hepática (TGO/AST, TGP/ALT, Gama-GT, Fosfatase alcalina, bilirrubina total) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune (LM); vacina Leish-Tec(LT) ; Vacina recombinante KMP-11 (KM); Tempos de avaliação: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 6º mês após o desafio experimental; Em vermelho estão representados os valores da média dos grupos que apresentaram cães com dosagens acima dos valores de referência.

D.3 - Proteinograma

Na tabela 9, estão representados os resultados do proteinograma. Os valores séricos de proteína total, albumina, globulina bem como a razão albumina/globulina nos tempos antes e após o término dos protocolos de imunizações vacinais (T0 e T1) estavam dentro dos padrões de normalidade (valores de referência) para cães (Tabela 9).

Em relação à avaliação do proteinograma seis meses após o desafio experimental (T2), foram observados para as dosagens de proteína total cães com valores acima dos níveis normais em todos os grupos. As dosagens séricas em T2 para albumina e globulina estavam dentro dos valores de normalidade em todos os grupos (Tabela 9). Entretanto, os grupos controle, LBSap e Leish-Tec apresentaram valores da razão albumina/globulina acima dos valores de referência (Tabela 9).

Tabela 9: Análises bioquímicas do proteinograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental

Grupos	Tempos	Proteína Total	Albumina	Globulina	Razão A/G
Valores Referência		6,4 – 8,9 (g/dL)	1,5 – 6,7 (g/dL)	0,7 – 6,3 (g/dL)	0,05 – 3,25
<i>T0</i>					
Controle^(a)		7,5±0,6	4,9±0,6	2,6±0,9	2,2±1,1
LBSap^(b)		7,3±0,6	4,6±0,5	2,7±0,8	1,9±0,7
Leishmune^(c)		7,8±0,6	5,0±1,0	2,7±0,8	2,1±1,1
Leish-Tec^(d)		7,5±0,8	4,7±0,4	2,8±1,0	1,9±0,9
KMP-11^(e)		8,0±0,5	4,8±0,5	3,2±0,8	1,6±0,5
<i>T1</i>					
Controle^(a)		6,7±1,9	2,4±0,6	3,5±1,3	0,7±0,4
LBSap^(b)		6,7±1,9	2,3±0,9	4,1±1,0	0,5±0,2
Leishmune^(c)		6,7±1,0	2,5±0,9	4,2±0,5	0,6±0,2
Leish-Tec^(d)		6,8±1,2	2,2±0,7	5,1±1,1	0,4±0,1
KMP-11^(e)		7,8±1,3	2,0±0,4	5,1±2,3	0,5±0,2
<i>T2</i>					
Controle^(a)		8,1±0,9	5,6±1,0	2,5±1,7	4,5±4,0
LBSap^(b)		8,1±0,9	5,7±0,8	2,3±0,9	3,0±1,5
Leishmune^(c)		8,9±0,9	5,3±0,7	3,6±1,3	1,7±0,8
Leish-Tec^(d)		8,4±0,6	5,5±1,1	3,0±1,4	3,7±5,2
KMP-11^(e)		8,3±0,8	5,4±0,5	2,9±0,6	1,9±0,5

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do proteinograma (proteína total, albumina, globulina e a razão albumina/globulina - A/G) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap); vacina Leishmune (LM); vacina Leish-Tec (LT) ; Vacina recombinante KMP-11 (KM); Tempos de avaliação: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a terceira imunização; T2 = 6º mês após o desafio experimental; Em vermelho estão representados os valores da média dos grupos que apresentaram cães com dosagens acima dos valores de referência.

6.2 - Imunogenicidade vacinal: resposta imune celular em ensaios *ex vivo* e *in vitro*

A) Avaliação *ex vivo* da resposta imune

O estudo do perfil celular dos grupos submetidos aos diferentes protocolos vacinais contou com a avaliação inicial do número absoluto de linfócitos totais do sangue periférico obtidos através do leucograma e da contagem diferencial das populações de leucócitos obtidas por microscopia óptica (Tabela 5). O perfil imunofenotípico destas células foi avaliado buscando-se ampliar o estudo de possíveis flutuações nas populações e subpopulações linfocitárias nos três tempos avaliados. Para isto foi realizado um estudo detalhado do perfil imunofenotípico por citometria de fluxo, ajustando os dados com o hemograma a fim de obter o valor absoluto de cada uma das subpopulações avaliadas. Os resultados da avaliação detalhada da imunogenicidade obtidas por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos do sangue periférico de cães controle e submetidos ao protocolo de imunizações com as diferentes vacinas abordadas serão ilustradas através de gráficos de linha das médias de valores absolutos de cada grupo, nos três tempos avaliados: antes (T0) e após (T1) os diferentes protocolos de imunização, e após seis meses do desafio experimental (T2). A seguir serão apresentados resultados significativos ($p < 0,05$) das alterações fenotípicas dos elementos celulares considerados importantes no contexto da resposta imune adquirida (linfócitos T $CD3^+$ bem como linfócitos $CD3^+CD4^+$ e linfócitos $CD3^+CD8^+$), seguido das demais alterações em fenótipos celulares marcantes da resposta imune inata (células NK e monócitos) e adquirida (linfócitos B). Os valores absolutos \pm desvio padrão das diferentes populações celulares estudadas, dos diferentes grupos e tempos, se encontram em anexo (11.2).

A.1 - Perfil fenotípico de linfócitos T ($CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) circulantes do sangue periférico

A avaliação do número absoluto da população de linfócitos T $CD3^+$ bem como de suas subpopulações de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ estão ilustradas na figura 8 (A, B e C).

Na análise da população de linfócitos T $CD3^+$ e da subpopulação de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos nos diferentes tempos (Figura 8A e B).

Considerando o valor médio absoluto de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em T1 os grupos LBSap e Leish-Tec apresentaram aumento desta subpopulação com relação ao grupo KMP11. O grupo de cães imunizados com a vacina LBSap também apresentaram um aumento desta subpopulação de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em T2 em relação ao grupo KMP11 e controle (Figura 8C).

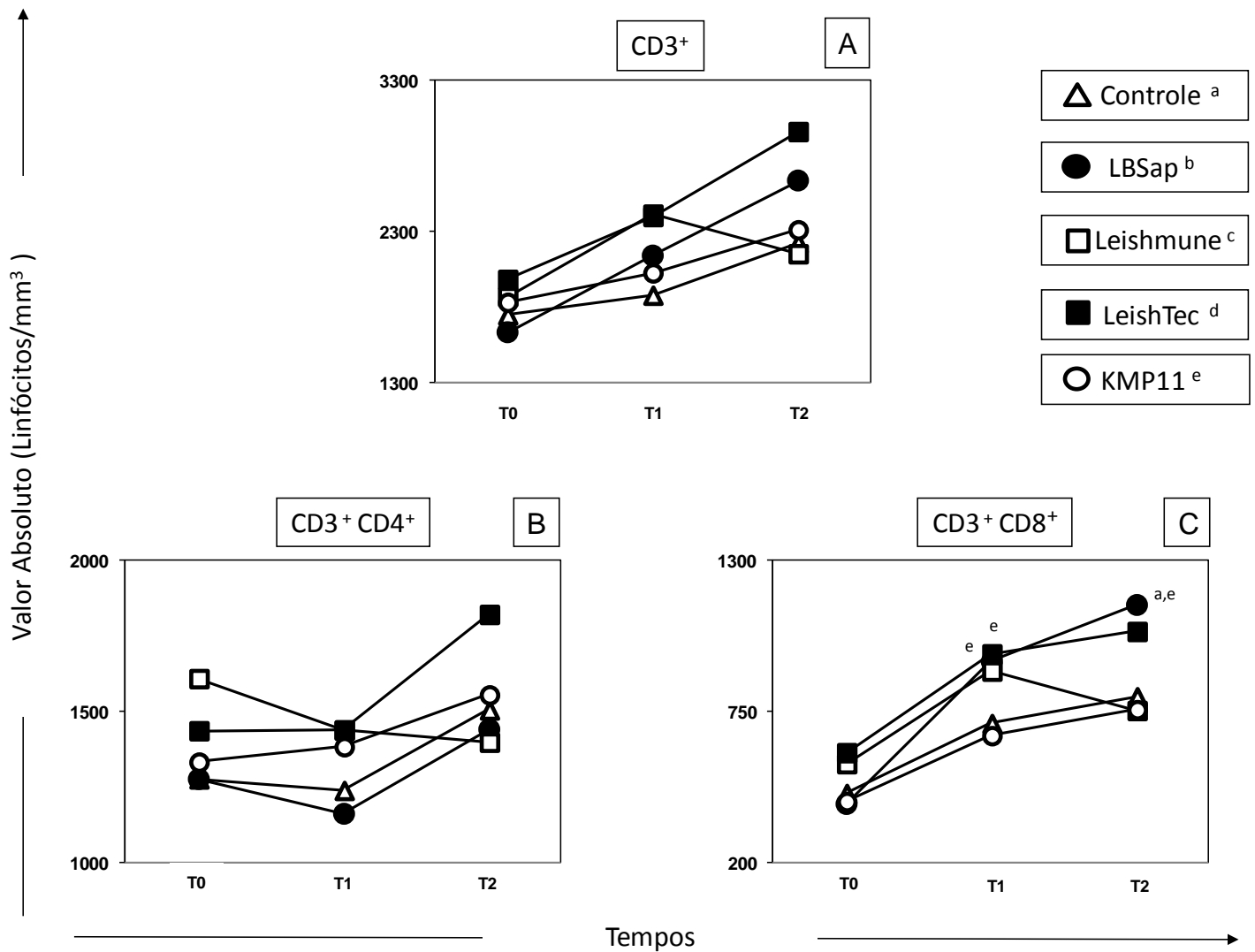


Figura 8: Perfil imunofenotípico de linfócitos circulantes em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a terceira dose vacinal; T2 = seis meses após o desafio experimental. O eixo y representa o número médio de linfócitos T (LT) $CD3^+$ (A), $CD3^+CD4^+$ (B) e $CD3^+CD8^+$ (C). As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente.

A.2 - Perfil fenotípico de linfócitos B, células NK (CD5⁻CD16⁺) e monócitos (CD14⁺) circulantes do sangue periférico

Na tentativa de encontrarmos alterações de fenótipos celulares marcantes da resposta imune inata avaliamos o perfil de células NK (CD5⁻CD16⁺) circulantes. Entretanto, não observamos diferenças significativas desta população celular nos diferentes grupos vacinais estudados nos tempos T0, T1 e T2 (Figura 9A).

O grupo Leishmune foi o único a apresentar diferenças significativas ($p < 0,05$) no perfil fenotípico de linfócitos B circulantes, apresentando em T1 aumento no valor absoluto de linfócitos B quando comparado com o grupo C (Figura 9B).

Buscando-se avaliar o perfil de potenciais células apresentadoras de antígenos, o número de monócitos CD14⁺ circulantes foi estudado nos diferentes grupos vacinais (Figura 9C). Neste contexto, a avaliação comparativa entre os grupos em T1 revelou um aumento significativo ($p < 0,05$) de monócitos CD14⁺ no grupo LBSap quando comparado com o grupo C e Leish-Tec. De forma semelhante, foi também observado em T1 um aumento de monócitos CD14⁺ nos grupos KMP11 e Leishmune em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo KMP11 apresentou um aumento de monócitos CD14⁺ em relação aos grupos C e Leishmune em T2.

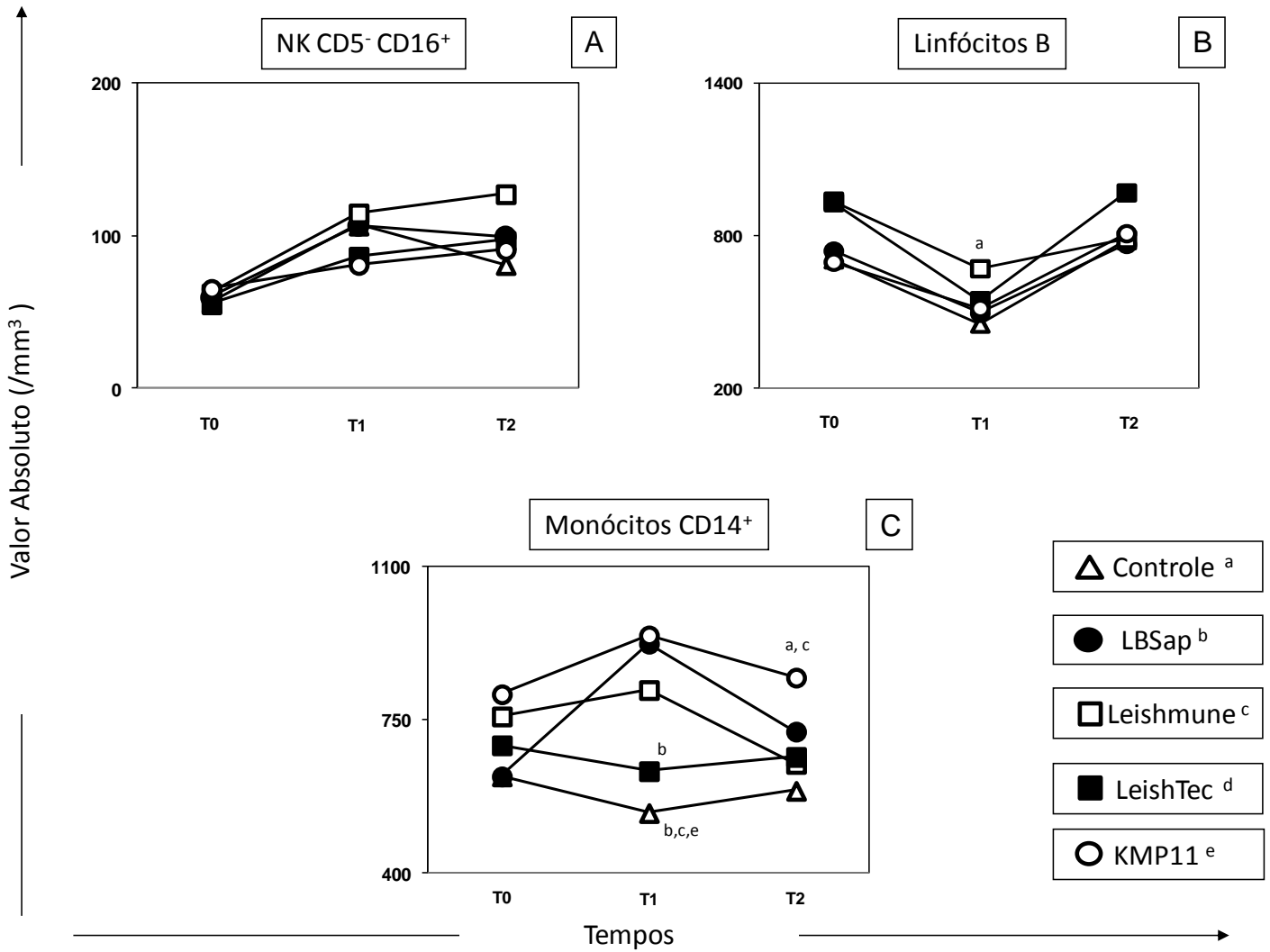


Figura 9: Perfil imunofenotípico de linfócitos B, Monócitos e Células NK circulantes em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a primeira dose vacinal; T2 = 15 dias após a segunda dose vacinal; T3 = 15 dias após a terceira dose vacinal. O eixo y representa o número médio de Células NK CD5⁻CD16⁺ (A), linfócitos B (B) e Monócitos CD14⁺ (C). As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente.

B) Avaliações *in vitro* da Resposta Imune

B.1 - Atividade linfoproliferativa e perfil imunofenotípico de subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) submetidos à estimulação antigênica com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*

A avaliação da capacidade linfoproliferativa antígeno específica foi realizada em T1 (quinze dias após a terceira dose vacinal) e T2 (seis meses após o desafio experimental) nos diferentes grupos vacinais utilizando antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) (Figura 10). Esta abordagem possibilitou a análise da capacidade de proliferação dos linfócitos frente ao reconhecimento de antígenos relacionados ao agente etiológico da leishmaniose visceral (ASLi). Os resultados foram expressos por índice de proliferação obtidos da divisão das médias dos linfócitos totais proliferados entre as culturas estimuladas (CE ou Ag) pelas culturas controles não estimuladas (CC ou C) (cultivadas apenas com meio RPMI) (ASLi/RPMI) nos diferentes grupos avaliados (Figura 10A).

A análise da atividade linfoproliferativa em T1 entre os diferentes grupos, revelou aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de proliferação nas culturas estimuladas com ASLi no grupo LBSap em relação as mesmas culturas dos grupos C e Leish-Tec. Também foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de proliferação no grupo Leishmune em relação ao grupo C. Interessantemente, o grupo controle apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de proliferação em T2 quando comparado a T1. É importante ressaltar que a resposta linfoproliferativa não específica, obtida após 5 dias de cultivo, pelo estímulo mitogênico com concanavalina A (ConA) resultou em valores médios entre 10 de índice de proliferação, confirmando a viabilidade da suspensão celular nos diferentes grupos avaliados.

Uma segunda abordagem desta análise *in vitro* buscou avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos através do índice de proliferação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) obtido pela razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) em relação as culturas controle não estimuladas (CC) (Figura 10B e 10C). A avaliação do índice de proliferação de linfócitos T CD4⁺ específicos em T1 revelou aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo LBSap quando comparado aos grupos C, Leish-Tec e Leishmune (Figura 10B). O valor do índice de proliferação de linfócitos T CD4⁺ específicos no grupo LBSap foi significativamente ($p < 0,05$) menor em T2 quando comparado ao

mesmo índice em T1 (Figura 10B). Também foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) de linfócitos T CD8⁺ específicos em T1 no grupo LBSap quando comparado aos grupos C, Leish-Tec e KMP-11 (Figura 10C). De forma semelhante, o valor do índice de proliferação de linfócitos T CD8⁺ específicos no grupo LBSap foi significativamente ($p < 0,05$) menor em T2 quando comparado ao mesmo índice de proliferação de linfócitos T CD8⁺ em T1 (Figura 10C).

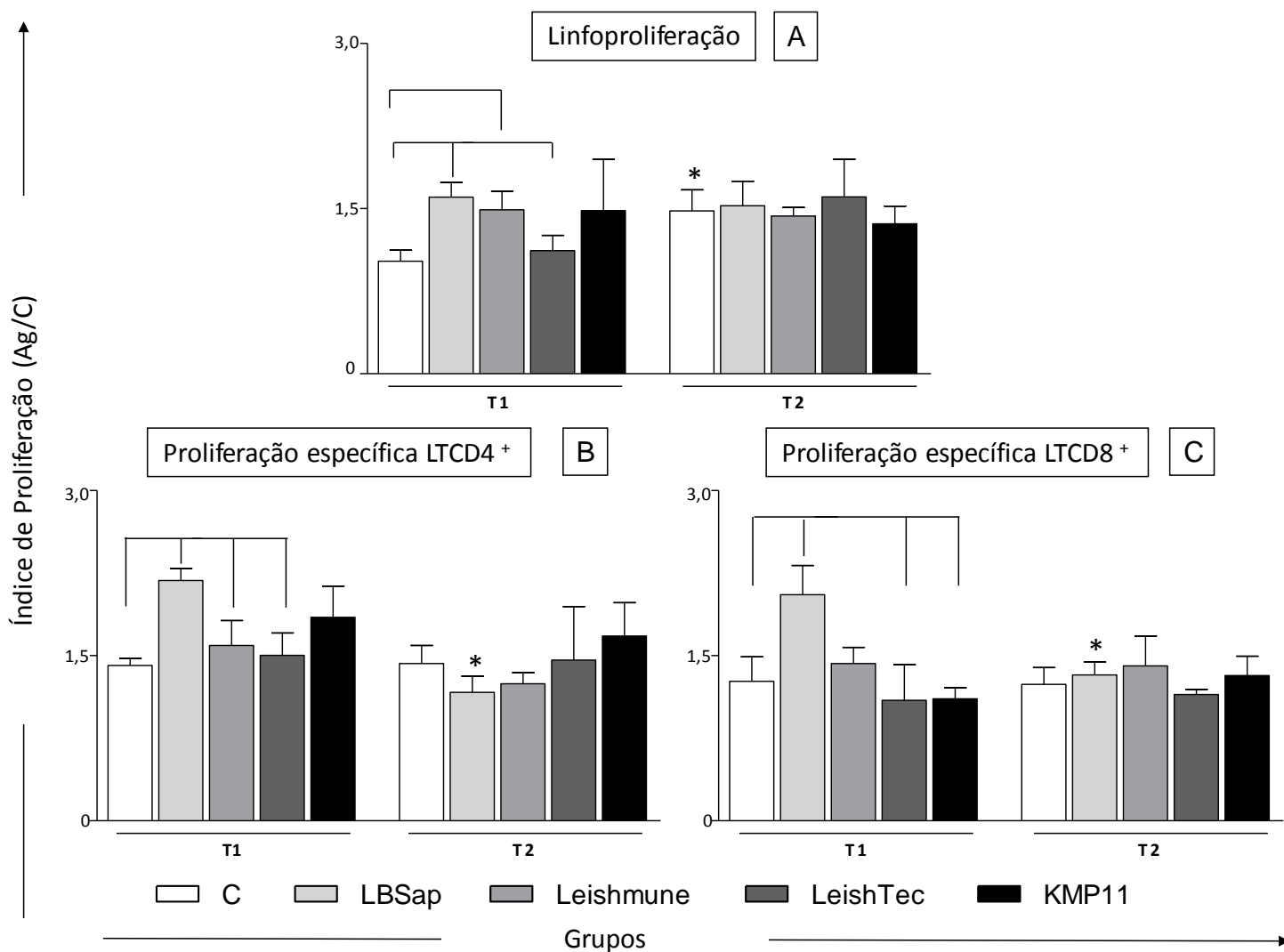


Figura 10: Índice médio de proliferação e desvio padrão de CMSP em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após estímulo *in vitro*. O eixo x ilustra em T1 (15 dias após terceira dose vacinal) e T2 (seis meses após o desafio experimental) os diferentes grupos vacinais: C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de proliferação (razão da média de linfócitos proliferados das culturas estimuladas com ASLi (Ag) pelas culturas controles não estimuladas (C)). (A) linfoproliferação total; (B e C) Proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos estão representadas por linhas conectivas. As diferenças significativas ($p < 0,05$) do mesmo grupo entre os tempos T1 e T2 estão representados pelo (*).

B.2 - Produção intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 em Linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*

Os resultados da avaliação de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4 após estímulo com antígeno solúvel de *L. infantum in vitro* serão apresentados na forma de índice correspondente à razão entre as culturas estimuladas com ASLi (Ag) e as culturas não estimuladas (C) (Ag/C; Figura 11).

Na avaliação da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ no grupo LBSap foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em T1 quando comparado com T0. De forma semelhante, este aumento no índice de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em T1 quando comparado ao tempo antes das imunizações (T0) também foi evidenciado no grupo KMP11. Entretanto, ao avaliarmos os grupos no mesmo tempo experimental, apenas o grupo LBSap apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em T1 quando comparado ao grupo controle em T1 (Figura 11B).

De forma interessante, foi observado no grupo LBSap aumento significativo ($p < 0,05$) de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em T1 e T2 quando comparado a T0. Semelhantemente à população de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em T1, o grupo LBSap também apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em T1 quando comparado ao grupo controle em T1 (Figura 11D). Adicionalmente, o grupo Leish-Tec apresentou aumentos significativos ($p < 0,05$) com relação à população de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ semelhantes ao grupo LBSap, ou seja, aumento de T0 para T1 ($p < 0,05$) sendo este aumento no índice de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em T1 significativo ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle em T1 (Figura 11D).

É importante ressaltar que não foram evidenciadas alterações significativas ($p < 0,05$) na produção intracitoplasmática da citocina IL-4 nos linfócitos T CD8⁺ entre nenhum dos grupos nos tempos T0, T1 e T2 (Figura 11C). Entretanto, em relação aos linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) desta população em T2 nos grupos Leish-Tec, KMP-11 e controle, em comparação com os valores dos índices dos próprios grupos ao longo dos tempos avaliados, sendo este aumento nos grupos Leish-Tec e KMP-11 em T2 com relação ao tempo T0, e o aumento do índice de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 no grupo controle em T2 em relação aos tempos T0 e T1 (Figura 11A).

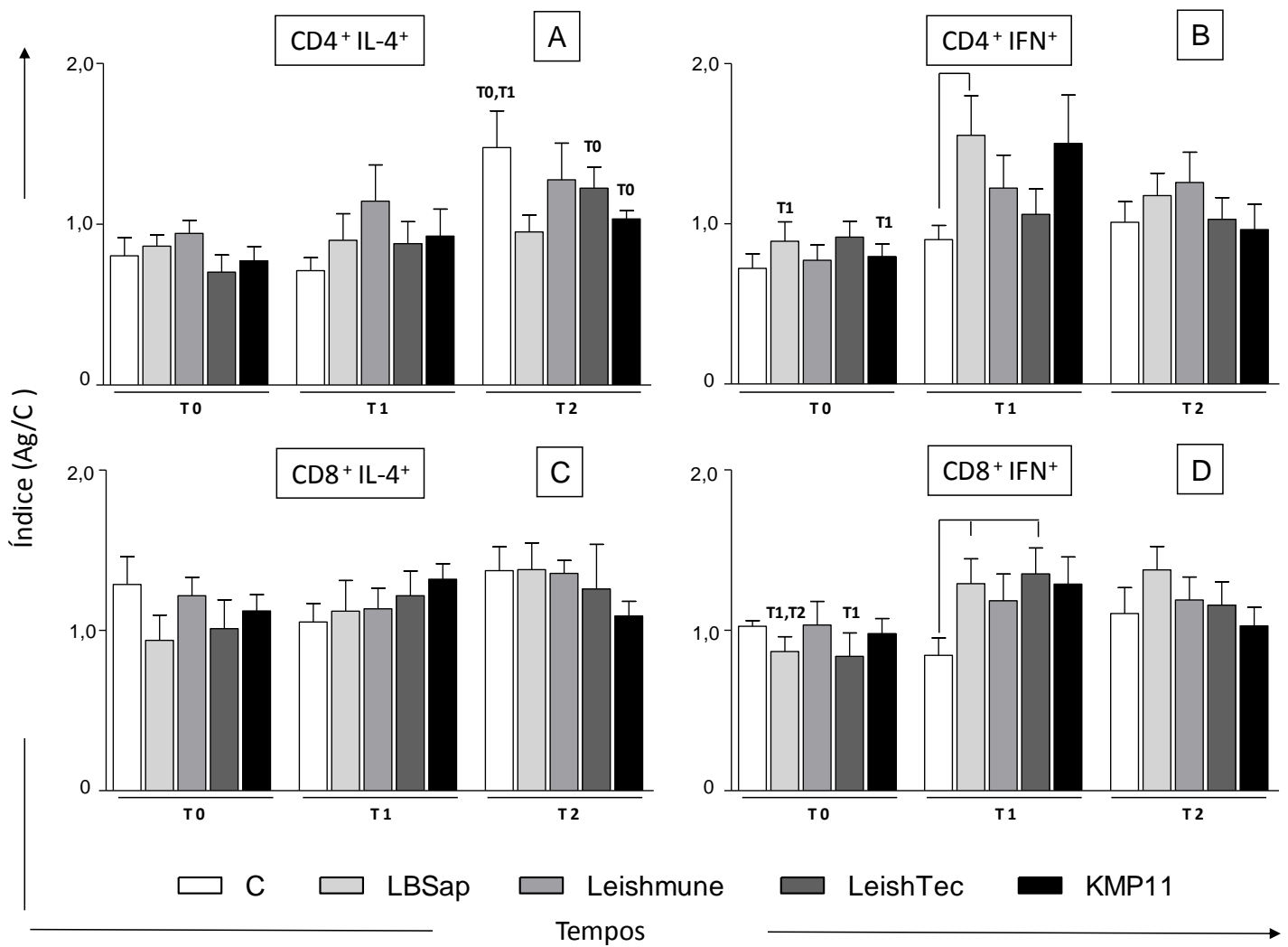


Figura 11: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após estímulo *in vitro*. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a terceira dose vacinal; T2 = seis meses após o desafio experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 calculados através da razão entre culturas estimuladas com ASLi e culturas controle não estimuladas (Ag/C). (A) linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4, (B) linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , (C) linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4, (D) linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ . As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos estão representadas por linhas conectivas. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados dentro de um mesmo grupo estão representados por T0, T1 e T2

C) Reatividade de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de cães imunizados com diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental, através do teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e ensaio imunoenzimático (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®])

A Figura 12 ilustra os resultados da avaliação da reatividade sérica de IgG total pelo ensaio imunoenzimático (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]) nos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec, KMP-11.

A avaliação da reatividade de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* no soro de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos testados no estudo revelou aumento significativo ($p < 0,05$) da média dos valores de densidade óptica em T1 nos grupos LBSap (T1: $0,249 \pm 0,073$), Leishmune (T1: $0,213 \pm 0,065$) e KMP-11 (T1: $0,188 \pm 0,032$) em relação aos grupos C (T1: $0,106 \pm 0,015$) e Leish-Tec (T1: $0,097 \pm 0,009$). Já a avaliação em T2, demonstrou um aumento significativo ($p < 0,05$) da média dos valores da densidade óptica nos grupos LBSap (T2: $0,230 \pm 0,070$), Leishmune (T2: $0,250 \pm 0,114$) e KMP-11 (T2: $0,204 \pm 0,047$) em relação apenas com o grupo Leish-Tec (T2: $0,117 \pm 0,032$) (Figura 12).

Ao analisarmos o valor da densidade óptica individualmente, por cada cão, afim de definirmos percentagens de cães positivos entre os grupos, ou seja, animais que apresentaram densidade óptica acima do *Cut-off*, foram encontrados os seguintes valores: T1 [Controle(0/7); LBSap(6/7); Leishmune(5/6); Leish-Tec(0/6); KMP-11(6/7)]; T2 [Controle(2/7); LBSap(6/7); Leishmune(5/6); Leish-Tec(2/6); KMP-11(5/7)] (Tabela 12).

No teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) realizado individualmente em todos os cães, de todos os grupos do estudo e nos tempos T0, T1 e T2, foi possível encontramos cães positivos apenas no tempo T2 sendo a razão (número de cães positivos sobre o número total de cães por grupo): Controle (3/7); LBSap (3/7); Leishmune (3/6); Leish-Tec (2/6); KMP-11 (2/7) (Tabela 10).

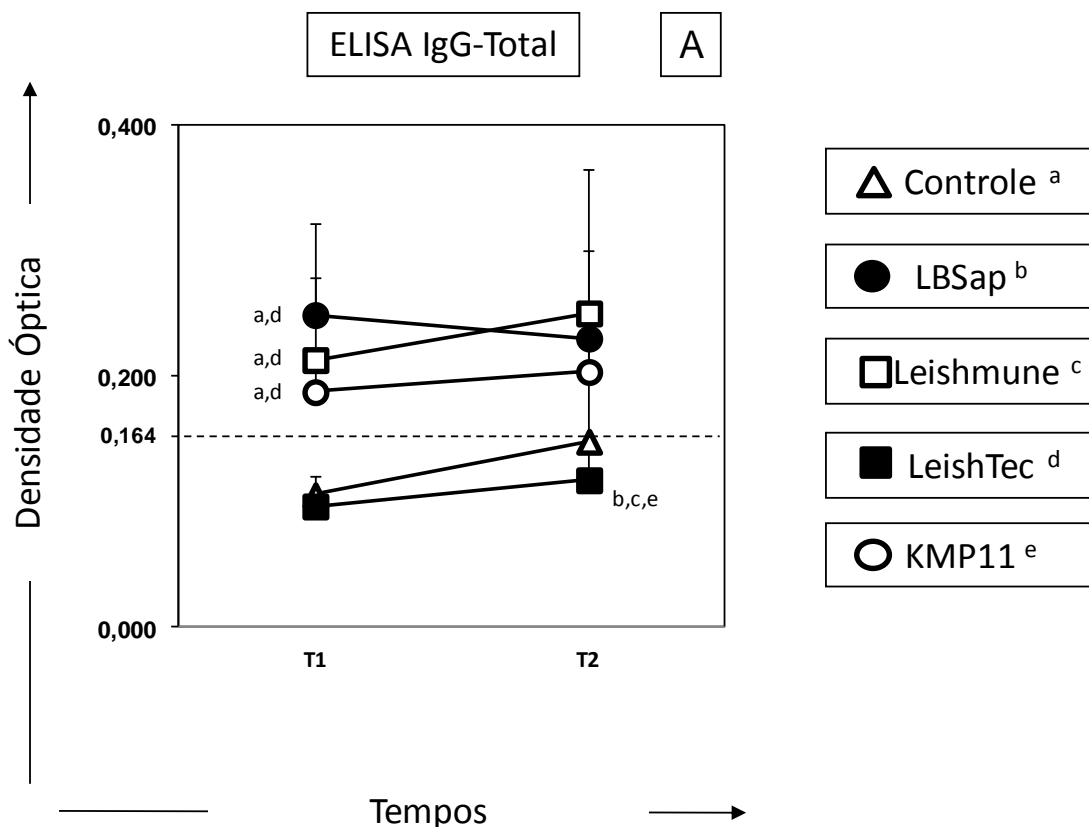


Figura 12: Reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* em soros de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes (T1) e após o desafio com *L. infantum* (T2). O eixo x ilustra os tempos de avaliação: T1(quinze dias após as três doses vacinais) e T2 (seis meses após o desafio experimental). O eixo y representa os valores médios da densidade óptica dos grupos pelo teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) utilizando-se soros [*cut-off* = 0,164]. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, relacionadas aos grupos C, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 respectivamente.

Tabela 10: Avaliações sorológicas de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais antes e após o desafio experimental.

Grupos	Tempos	ELISA	DPP
<i>T0</i>			
Controle ^(a)		0/7	0/7
LBSap ^(b)		0/7	0/7
Leishmune ^(c)		0/6	0/6
Leish-Tec ^(d)		0/6	0/6
KMP-11 ^(e)		0/7	0/7
<i>T1</i>			
Controle ^(a)		0/7	0/7
LBSap ^(b)		6/7	0/7
Leishmune ^(c)		5/6	0/6
Leish-Tec ^(d)		0/6	0/6
KMP-11 ^(e)		6/7	0/7
<i>T2</i>			
Controle ^(a)		2/7	3/7
LBSap ^(b)		6/7	3/7
Leishmune ^(c)		5/6	3/6
Leish-Tec ^(d)		2/6	2/6
KMP-11 ^(e)		5/7	2/7

Número de cães positivos em cada grupo para as avaliações sorológicas: teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]) e ensaio imunoenzimático (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]) nos tempos: T0 = antes da primeira dose vacinal; T1 = 15 dias após a terceira dose vacinal; T2 = seis meses após o desafio experimental.

6.3- Potência vacinal:

A) Avaliação dos sinais clínicos sugestivos de LVC após o desafio experimental

Todos os cães após o desafio experimental foram avaliados sistematicamente por um médico veterinário, com o objetivo de monitorar os sinais e sintomas clínicos típicos da LVC após o desafio experimental.

Assim, de uma forma geral, em seis meses após o desafio experimental (T2) foi possível identificar em alguns cães sinais e sintomas clínicos típicos de LVC. O grupo controle apresentou um maior número de animais (3/7) com sinais/sintomas da doença, sendo que estes animais apresentaram pelo menos dois sinais clínicos compatíveis com a doença. Além disso, os animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos mais exuberantes da LVC, como: emagrecimento, lesão no focinho, despigmentação da mucosa, linfadenopatia, apatia, conjuntivite, perda de pêlo.

Na tabela 11 encontram-se registrados os principais sinais/sintomas clínicos evidenciados nos cães em T2 nos diferentes grupos. Assim, foi possível observar dentro os sinais/sintomas mais frequentes: perda de peso, alterações no focinho, linfadenopatia, apatia. É importante salientar, que foi considerada como perda de peso/perda de massa corporal a diminuição de pelo menos dois quilogramas no peso total do animal. Dentre

as alterações no focinho dos cães encontradas foram: lesão crostosa, lesão ulcerativa, despigmentação.

Desta forma, foram observamos: Grupo Controle: (2/7) perda de peso; (2/7) alterações no focinho; (2/7) linfadenopatia; (1/7) apatia. Grupo LBSap: (1/7) perda de peso; (0/7) alterações no focinho; (1/7) linfadenopatia; (0/7) apatia. Grupo Leishmune: (2/6) perda de peso; (0/6) alterações no focinho; (1/6) linfadenopatia; (0/6) apatia. Grupo Leish-Tec: (2/6) perda de peso; (0/6) alterações no focinho; (0/6) linfadenopatia; (0/6) apatia. Grupo KMP-11: (3/7) perda de peso; (1/7) alterações no focinho; (0/7) linfadenopatia; (1/7) apatia.

Tabela 11: Avaliação Clínica em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio experimental com *L.infantum*

Grupos	Tempos	Perda de Peso	Alterações no Focinho	Linfadenopatia	Apatia
T2					
Controle ^(a)		2/7	2/7	2/7	1/7
LBSap ^(b)		1/7	0/7	1/7	0/7
Leishmune ^(c)		2/6	0/6	1/6	0/6
Leish-Tec ^(d)		2/6	0/6	0/6	0/6
KMP-11 ^(e)		3/7	1/7	0/7	1/7

Número de cães em cada grupo com sinais/sintomas clínicos sugestivos de LVC, seis meses após o desafio experimental (T2): perda de peso, alterações no focinho, linfadenopatia, apatia.

B) Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea

Com objetivo de rastrear a presença do parasito e/ou de seu DNA foi escolhido neste estudo a medula óssea como órgão alvo desta investigação. Os dados obtidos estão demonstrados na tabela 12, onde os resultados da avaliação parasitológica na medula óssea empregando-se como métodos de diagnósticos o isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT ou a PCR em tempo real nos grupos de cães avaliados após seis meses do desafio experimental endovenoso com *L. infantum*.

B.1- Isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT (Mielocultura)

Com relação à mielocultura (NNN/LIT) foi relatado o isolamento do parasito em 15 dos 33 cães do experimento (conforme demonstrado na tabela 12) após seis meses do

desafio experimental. Estes cães positivos pertenciam aos grupos Controle (3/7), LBSap (2/7), Leishmune (2/6), Leish-Tec (3/6), KMP-11 (5/7) (Tabela 9).

Tabela 12: Avaliações parasitológicas em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais seis meses após o desafio experimental

Grupos	Mielocultura	qPCR	qPCR (Carga/ml)
Controle^(a)	3/7	3/7	205100 ^{b,c,d,e}
LBSap^(b)	2/7	2/7	4373 ^{c,d}
Leishmune^(c)	2/6	2/6	93480
Leish-Tec^(d)	3/6	3/6	50450
KMP-11^(e)	5/7	5/7	9718 ^{c,d}

Número de cães em cada grupo com presença do parasito na medula óssea, seis meses após o desafio experimental (T2), identificados pela técnica de mielocultura e PCR por tempo real, bem como os valores absolutos do número de amastigotas na medula óssea (amastigotas/mL) obtidos na qPCR. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, relacionadas aos grupos controle, LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11, respectivamente.

B.2 – Avaliação da carga parasitária na medula óssea através da PCR em tempo real

Atualmente, a PCR em tempo real (qPCR) vem sendo empregada para o diagnóstico bem como para monitoramento de tratamentos e após imunizações vacinais, no sentido de avaliar a presença e/ou redução da carga parasitária em animais submetidos a estas intervenções em diferentes protocolos experimentais.

Em nosso estudo, a técnica de qPCR foi utilizada para determinar a carga parasitária em amostras de aspirados de medula óssea seis meses após o desafio experimental em cães previamente imunizados com diferentes imunobiológicos, no sentido de estimar a potência das diferentes vacinas testadas.

A carga parasitária avaliada por qPCR mostrou que os grupos dos quatro diferentes imunobiológicos testados no estudo, apresentaram cães com parasito na medula óssea detectável pela técnica de qPCR. Entretanto, em todos os grupos vacinais a carga parasitária na medula óssea (amastigotas/mL de tecido) foi significativamente ($p < 0,05$) menor em relação ao grupo controle. Os cães que receberam os protótipos vacinais LBSap e KMP-11 apresentaram menor carga parasitária ($p < 0,05$) na medula

óssea quando comparados aos grupos que receberam as vacinas comerciais Leishmune e Leish-Tec (Tabela 12). De forma interessante, a menor carga parasitária na medula óssea foi do grupo LBSap, sendo 46,9 vezes menor em relação à carga do grupo controle. Além disso, o grupo LBSap não apresentou positividade na reação de qPCR, tendo carga parasitária igual a zero, em 72% (2/7) dos cães, em comparação a 29%(5/7) KMP-11, 66%(2/6) Leishmune, 50%(3/6) Leish-Tec, 57%(3/7) controle.

Estes resultados demonstram o importante efeito da vacinação, independente do imunobiológico utilizado, na diminuição da carga parasitária da medula óssea, sugerindo que os diferentes imunobiológico testados neste estudo foram capazes de gerar um perfil de resposta imune com ação protetora contra *L. infantum*.

7. Discussão

A leishmaniose é uma doença negligenciada e está entre as seis maiores endemias mundial (WHO, 2010), e em termos globais é a terceira doença parasitária mais importante transmitida por vetor, depois da malária e filariose (Reithinger & Davies 2002). Mesmo com os avanços científicos relacionados ao diagnóstico, tratamento e prevenção ocorridos nos últimos 10 anos, epidemias urbanas de LV são observadas em várias cidades do Brasil e do mundo, além disso, a doença apresenta elevadas taxas de morbimortalidade com preocupante tendência ao crescimento (WHO 2010).

Em virtude das características epidemiológicas e da complexidade relacionada à cadeia de transmissão da leishmaniose visceral, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios no ambiente urbano (cães soropositivos) e atividades de educação em saúde (MS/Brasil, 2009). Um grande problema que dificulta a adoção e manutenção prolongada destas medidas profiláticas é a resistência dos proprietários de cães sororeagentes para *Leishmania* em colaborar com o programa de controle, principalmente pelo fato de mais da metade dos cães soropositivos apresentarem-se clinicamente saudáveis (assintomáticos). Apesar de todas as medidas preconizadas há quase 60 anos ainda não há evidências científicas fortes que amparem estas medidas, de forma que possam ser feitas isoladas e/ou associadas e seu real impacto em áreas endêmicas para LV. Da mesma maneira que existem trabalhos que defendem e preconizam as medidas de controle em seu tripé de ações (Ashford *et al.*, 1993, 1998; Braga *et al.*, 1998; Jerônimo *et al.*, 2000), há outros estudos que admitem que estas medidas promovam poucos efeitos sobre a queda da incidência de casos humanos no Brasil (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Costa, 2011; Ribas *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, milhares de cães soropositivos foram recolhidos e eutanasiados no Brasil (único país no mundo a realizar esta medida de controle), mesmo assim, o número de municípios com transmissão autóctone e a incidência da LVH e LVC tem aumentado e espalhado pelo Brasil e em diversos outros países da América do Sul e Europa (Alvar *et al.*, 2012). Outro ponto extremamente importante no contexto do controle da LV são os métodos de diagnóstico sorológicos empregados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), pois os mesmos são incapazes de diferenciarem cães infectados dos cães infecciosos (Coura-Vital *et al.*, 2014). Desta forma, naturalmente inúmeros cães são diariamente condenados a eutanásia, mesmo podendo ser animais que

não atuam como reservatórios do parasito, apesar de estarem naturalmente infectados. Tais fatos agravam a manutenção das medidas de controle direcionadas ao reservatório doméstico da *L. infantum* no Brasil tornando-se eminente a necessidade de novas alternativas a serem incorporadas no PCLV em um futuro próximo.

Desta forma, a eutanásia de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, torna-se cada vez mais questionável e inaceitável, além de provocar indignação e um sofrimento profundo dos proprietários com a perda dos animais. Uma alternativa para evitar a eutanásia dos animais acometidos pela LVC seria a busca de medidas terapêuticas ou imunoproláticas eficazes e que sejam capazes de retirá-los da condição de reservatórios. O MS proibiu o tratamento da LVC com os medicamentos que são utilizados para o tratamento em humanos, uma vez que as tentativas de tratamentos da LVC empregando estes fármacos, não têm logrado êxito na obtenção da cura parasitológica em cães ou até mesmo na eliminação do parasito na derme dos cães. Assim, estes tratamentos não impedem a transmissão do parasito a flebotomíneos, e ainda podem possibilitar a seleção de cepas resistentes às drogas. Sendo assim, a imunoprolaxia aparece como uma alternativa promissora para a prevenção da LVC, atuando no sentido de diminuir a incidência dos casos caninos e, conseqüentemente, da doença humana (Marzochi *et al.*, 1985; Genaro, 1993; Hommel *et al.*, 1995; Genaro *et al.*, 1996a; Gradoni, 2001; Handman, 2001, Desjeux, 2004; Ravindran & Ali, 2004; Requena *et al.*, 2004; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Noazin *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; WHO, 2010).

No intuito de se desenvolver uma vacina contra LV, inúmeros esforços tem sido realizados para identificar potenciais antígenos vacinais, principalmente, em modelos murinos (Modabber, 1995, Wilson *et al.*, 1995, Webb *et al.*, 1996, Webb *et al.*, 1998, Dole *et al.*, 2000, Dumonteil *et al.*, 2001, Gradoni, 2001, Handman, 2001, Mauel, 2002, Brodskyn *et al.*, 2003, Ravindran e Ali, 2004, Requena *et al.*, 2004, Khamesipour *et al.*, 2006). Apesar de sua importância, a triagem de antígenos vacinais utilizando este modelo não pode ser necessariamente extrapolada a outras espécies (Gradoni, 2001; Seok *et al.*, 2013), ilustrando a complexidade da relação *Leishmania*-hospedeiro. É importante ressaltar que o cão é considerado o melhor modelo experimental para os estudos pré-clínicos e clínicos de testes de drogas e vacinas contra a LVH, pois apresenta curso da infecção, com características clínico-patológicas, semelhantes à doença humana assintomática e ativa, além de ser o principal alvo das medidas de controle (Genaro, 1993; Moreno & Alvar, 2002; Alvar *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2006a;

Reis *et al.*, 2009), e ter mais proximidade genética com o homem (Kirkness *et al.*, 2003, Starkey *et al.*, 2005). Neste sentido, a melhor estratégia para triagem de potenciais antígenos candidatos a vacina anti-LV seria a avaliação utilizando o próprio cão como modelo experimental.

Nas últimas décadas, diferentes grupos de pesquisa tem se dedicado ao estudo de uma vacina anti-LVC que tenha eficácia comprovada, para de fato poder atuar contra a expansão da LV (Mayrink *et al.*, 1996; Genaro *et al.*, 1996b; Mohebbali *et al.*, 2004; Borja-Cabrera *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007; Holzmuller *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2005, 2007; Bourdoiseau *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2008; Fujiwara *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; Gradoni *et al.*, 2005; Molano *et al.*, 2003; Carcelén *et al.*, 2009; Poot *et al.*, 2009; Ramiro *et al.*, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b; Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Giunchetti *et al.*, 2008d; Araújo *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Roatt *et al.*, 2012; Aguiar-Soares *et al.*, 2014). Neste sentido, tem sido proposto que antígenos brutos apresentam bons indicadores de sucesso no desenvolvimento de vacinas contra protozoários, já que contemplam múltiplas subunidades antigênicas com capacidade de ativação de um maior repertório de linfócitos T (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Giunchetti *et al.*, 2008d; Reis *et al.*, 2010; Roatt *et al.*, 2012; Aguiar-Soares *et al.*, 2014). Adicionalmente, estes antígenos geralmente apresentam maior estabilidade em relação às subunidades purificadas ou vacinas de DNA, que necessitam de tecnologia mais sofisticada de produção, onerosa infra-estrutura, além de maior complexidade e dificuldades metodológicas, muitas vezes inacessíveis a países em desenvolvimento (Khamesipour *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). As vacinas de antígenos brutos apresentam ainda vantagens adicionais relacionadas à menor necessidade de se realizar testes para se chegar a um produto final, minimizando os custos de sua produção (Khamesipour *et al.*, 2006).

Até o momento, duas composições vacinais, contendo antígenos de segunda geração, foram licenciadas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as vacinas Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal S/A) e Leishmune[®] (Zoetis Saúde Animal). Entretanto, apesar dos resultados já publicados nas avaliações das vacinas Leishmune[®] e Leish-Tec[®], e ambas as vacinas possuem registro e licença no MAPA para produção vacinal e comercialização em clínicas veterinárias, o MS não preconiza o uso destas vacinas como medida de controle e profilaxia da LV em larga

escala no Brasil. O MS considera que ainda não há evidências científicas que comprovem a eficácia destes produtos, principalmente, se estas vacinas são capazes de reduzir a incidência da doença em cães, e assim, em humanos. Em 2007, o MS através da Instrução Normativa Interministerial 31 (IN-31) exigiu uma série de estudos a serem realizados nestas vacinas, a fim dessas terem suas licenças renovadas, entre as medidas, se destacam: (i) avaliar o potencial de bloqueio da infecção em flebotomíneos (teste por xenodiagnóstico), (ii) avaliar a possibilidade de se diferenciar animais vacinados dos cães naturalmente infectados por métodos de diagnóstico convencionais, evitando dificultar o PVCLV no processo de eliminação de cães doentes (iii) e serem validadas por diferentes grupos de pesquisa através de estudos multicêntricos sem interesse comercial/científico nestes produtos sobre a real contribuição na redução da incidência da LV humana e canina em áreas endêmicas para LV (MS/Brasil, 2005, 2007, 2009). Estas análises foram realizadas, relatórios destes estudos foram gerados e enviados ao MS e ambas as vacinas mantiveram suas licenças perante o MAPA. Possivelmente estes estudos fornecerão subsídios para a proposição destas e de outras vacinas de modo que possam ser indicadas em programas oficiais de controle da LV, entretanto, esses relatórios contendo os ensaios de Fase III duplo-cego randomizados ainda não foram publicados na literatura científica.

Considerando a necessidade de investir e ampliar o desenvolvimento de vacinas anti-LVC que atendam aos pré-requisitos acima mencionados (IN-31), torna-se fundamental o estudo detalhado de potenciais imunobiológicos, para que alcancem a finalidade de serem utilizadas no PVCLV. Devido à falta de consenso, bem como a falta de regulação da IN-31, no que tange aos testes clínicos vacinais de Fase I e II, o presente estudo se propôs avaliar a inocuidade, toxicidade, imunogenicidade e potência de dois protótipos vacinais, LBSap e KMP-11, de forma comparativa com as vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®], em um ensaio clínico de fase I e II em canil fechado. Assim, o presente trabalho, buscou aprimorar a dinâmica da seleção de futuros candidatos vacinais visando os ensaios clínicos de Fase III, e auxiliando na busca de uma vacina efetiva que possa ser utilizada no PVCLV como medida para combater a crescente expansão da LV. A seguir serão discutidos os resultados obtidos no presente estudo principalmente sob os aspectos da inocuidade, imunogenicidade e potência vacinal.

O início da caracterização dos imunobiológicos avaliados neste estudo contou com a descrição de importantes parâmetros relacionados à segurança biológica

conferida durante as três imunizações. Neste sentido, o estudo de aspectos relacionados à inocuidade e toxicidade focalizando na avaliação de novos imunobiológicos se apresenta como uma etapa fundamental, pois possibilita a identificação de alterações incompatíveis com a administração do produto testado. Uma vez estabelecida estas avaliações o imunobiológico poderá estar apto para prosseguir com os ensaios de imunogenicidade e potência.

As avaliações da inocuidade e toxicidade realizadas neste trabalho não identificaram alterações clínicas que comprometessem a saúde dos animais imunizados com as diferentes vacinas, desta forma todos os produtos podem ser considerados inócuos. Entretanto, foram observadas, principalmente, alterações no local do inoculo vacinal com os grupos LBSap, KMP-11 e Leishmune[®]. Estas alterações foram discretas, uma vez que na maioria dos animais, apresentaram apenas a presença de pequenos nódulos circunscritos, não ulcerados, de consistência firme (Giunchetti *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2014). Em alguns cães desses grupos, foi também observado edema leve e dor á palpação no local de inoculação das vacinas. A presença de dor edema no local do inoculo vacinal com Leishmune[®] foi também relatado por Fernandes *et al.* (2014), bem como está descrito na bula desta vacina, como possíveis efeitos adversos a vacinação. Torna-se importante salientar, que estes efeitos foram transientes e regrediram por completo 72 horas após vacinação (Giunchetti *et al.*, 2007). Além disto, tais efeitos adversos são fortemente relacionados ao adjuvante empregado nas vacinas, que neste caso para todas as composições vacinais aqui testadas a saponina foi o único adjuvante empregado.

Alguns pesquisadores empregando saponina como adjuvante relatam a presença de outros efeitos adversos, que não foram evidenciados em nosso estudo, como: perda de pêlos no local do inóculo, anorexia, apatia, vômito e diarreia (Santos *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007; Rajput *et al.*, 2007; Fernandes *et al.* 2014). Interessantemente, apesar de empregar a saponina como adjuvante, o grupo Leish-Tec não apresentou qualquer tipo de alteração macroscópica no local do inóculo vacinal, durante ou após as três doses vacinais (Fernandes *et al.*, 2008). Nossos resultados se assemelham ao estudo conduzido por Fernandes *et al.* (2008), em cães beagles imunizados com a vacina Leish-Tec[®]. Entretanto, são divergentes dos resultados encontrados por Fernandes *et al.* (2014) que observaram reações adversas mais fortes e em maior número, seja local ou sistemicamente, em cães imunizados com Leish-Tec[®] em comparação com a vacina Leishmune[®].

Conforme mencionado anteriormente, as reações adversas observadas no local do inóculo vacinal são atribuídas ao adjuvante saponina. Em geral, observou-se que tanto a ocorrência quanto a gravidade das reações adversas, aumenta de acordo com o número de doses da vacina. Os efeitos tóxicos dependentes de saponina são conhecidos por variar de acordo com a pureza do composto e a dose utilizada (Kensil *et al.*, 1991; Oliveira-Freitas *et al.*, 2006). Isso pode explicar a maior frequência de cães com alterações no local do inóculo vacinal, nos grupos LBSap e KMP-11, pois receberam 1 miligrama (1 mg) do extrato de *Quillaja saponaria* Molina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.), diferentemente dos grupos Leishmune e Leish-Tec, que receberam 0,5 miligrama (0,5mg) da saponina Riedel de Haen, de acordo com a bula de seus fabricantes.

A saponina da Riedel de Haen é uma mistura extraída da *Quillaja saponaria* Molina (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004) cujos componentes ativos são a saponina QS21 e saponinas deaciladas (Oliveira-Freitas *et al.*, 2006). A capacidade da saponina QS-21 de estimular tanto a resposta Th1 como Th2, contra antígenos exógenos, faz dela ideal para uso em vacinas contendo subunidades, e vacinas contra patógenos intracelulares, assim como vacinas terapêuticas contra o câncer (Sun *et al.*, 2009). Por conter a saponina QS21, as vacinas provocam estas reações de inchaço/edema no local da injeção (Kensil *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2002). Estas são reações inflamatórias locais e espontaneamente reversíveis, associadas à presença de dor e, portanto, indesejadas no desenvolvimento de qualquer vacina. Por outro lado, foi observado que as saponinas menos tóxicas, após tratamento químico, também perdem em potencial adjuvante.

Apesar destes efeitos adversos, em vacinas em desenvolvimento contra LV, a correta associação entre o adjuvante vacinal e o antígeno é fundamental na intensidade, duração, rápida e efetiva resposta imune. Neste sentido, a saponina apresenta-se como um excelente adjuvante indutor de resposta celular (Cox & Coulter, 1997, Rajput *et al.*, 2007; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008; Vitoriano-Souza *et al.*, 2012), estimulando principalmente a indução de linfócitos T CD8⁺ (Kensil, 1996; Vitoriano-Souza *et al.*, 2012), sendo utilizado amplamente em vacinas veterinárias (Rajput *et al.*, 2007), além de terem um baixo custo e simples formulação. Desta forma, considerando a dificuldade na identificação de adjuvantes indutores de resposta celular, compatível com perfil Th1 de resposta imune, que favoreçam sua utilização em vacinas contra protozoários, nossos resultados apontam para mínimos efeitos colaterais possibilitando a utilização da saponina como adjuvante vacinal em vacinas contra LVC.

A repercussão sistêmica da inocuidade e toxicidade dos imunobiológicos aqui testados por nós, foi avaliada pela variação do peso corporal e da temperatura retal dos animais. Não foi encontrada variação no peso corporal acima de um quilograma ao longo das imunizações. Além disto, a maioria dos cães dos diferentes grupos avaliados mantiveram a temperatura corporal dentro da faixa considerada como normal (até 39,5°C) para cães. Embora tenha sido observado aumento da temperatura retal (temperatura >39,5°C) de forma individual e esporádica em alguns animais nos grupos LBSap, Leishmune e KMP-11 nos diferentes tempos avaliados, nenhum destes animais apresentou o estado fisiológico febril (temperatura >39,5°C) após 72h do inóculo vacinal, sendo importante relatar que em nenhum cão a temperatura retal ultrapassou 41 °C. Estas oscilações na temperatura corporal podem ser atribuídas à hiperatividade do cão no momento da avaliação (Giunchetti, 2007; Moreno *et al.*, 2012).

Não foram observadas alterações hematológicas (leucograma e eritrograma) nem alterações bioquímicas (função renal, hepática e proteinograma) no final das imunizações com as diferentes vacinas. Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores em estudos anteriores que empregam formulações semelhantes de vacinas e adjuvantes (Fernandes *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2008; Fiuza *et al.*, 2013). Nenhum cão apresentou valores destes parâmetros abaixo ou acima dos valores de referência. Apenas foi possível observar aumento da global de leucócitos nos grupos LBSap e KMP-11, promovido principalmente pelo aumento de neutrófilos, entretanto, esse aumento transitório é considerado normal e inerente ao repertório antigênico vacinal e ao adjuvante saponina (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c, Vitoriano-Souza *et al.*, 2008). Diferentemente, Araújo *et al.* (2008) não relatam alterações no hemograma de cães submetidos à imunização por uma vacina monovalente composta por antígeno total de *L. amazonensis*, mas, de forma semelhante, não observaram alterações nos cães imunizados com a vacina Leishmune[®]. Fiuza *et al.*, (2013) observaram resultados hematológicos e bioquímicos em cães imunizados com a vacina Leishmune[®], semelhantes ao nosso estudo.

Com o intuito de melhorar a caracterização da imunogenicidade de vacinas anti-LVC, tem sido empregada a metodologia de citometria de fluxo para imunofenotipagem de leucócitos caninos (Fujiwara *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2005), esta ferramenta vem sendo utilizada na tentativa de estabelecer padrões associados ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora em ensaios clínicos vacinais (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Araújo *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2008;

Borja-Cabrera *et al.*, 2008; Fiuza *et al.*, 2013), como também na busca de um perfil celular ligado à resistência ou susceptibilidade a infecção por *L. infantum* (Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006b; Giunchetti *et al.*, 2008a; Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Neste sentido, neste estudo foi realizada a imunofenotipagem de leucócitos caninos por citometria de fluxo com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores relacionados à imunogenicidade vacinal antes e após o desafio experimental com *L. infantum*.

O grupo Leishmune foi o único a apresentar um aumento na população de linfócitos B circulantes. Este evento poderia estar associado à ativação de linfócitos B e diferenciação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, justificando a alta produção de anticorpos séricos induzidos após as três doses vacinais com este imunobiológico. Bourdoiseau *et al.* (1997b) relataram que ocorre uma imunossupressão nos cães doentes na LVC, caracterizado por queda de linfócitos B CD21⁺. Na história natural da LVC, Reis *et al.*, (2006b) descreveram que a diminuição na população de linfócitos B CD21⁺ estaria relacionada ao aumento da carga parasitária na medula óssea, presença de sinais clínicos da doença e prognóstico de severidade na LVC. Assim, o aumento de linfócitos B CD21⁺, característico do grupo imunizado com a vacina Leishmune[®], parece ser um biomarcador de resistência na LVC. Diferentes autores, também observaram que após o protocolo de imunização da vacina Leishmune[®] os cães não apresentaram aumento nas subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) circulantes, entretanto, diferente do nosso resultado, não foi observado aumento na frequência de linfócitos B (CD21⁺) (Araujo *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2010; Fiuza *et al.*, 2013).

As avaliações adicionais relacionadas ao perfil imunofenotípico de linfócitos T circulantes permitiram a identificação de alterações no perfil deste marcador nos grupos LBSap e Leish-Tec. Neste sentido, os grupos LBSap e Leish-Tec apresentaram aumento do número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ do sangue periférico após o término do protocolo vacinal (T1). É importante relatar que o grupo imunizado com a vacina LBSap foi o único que apresentou aumento no valor absoluto de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ circulantes após cada uma das três doses de imunização vacinal (dados não mostrados). Estudos utilizando modelos experimentais e pacientes humanos abordando infecções com patógenos intracelulares mostram que o estabelecimento de imunidade protetora está diretamente ligado a presença de linfócitos T CD8⁺ associado ao perfil de resposta Th1 (Seder & Hill, 2000). Da mesma forma, Reis *et al.* (2006b), mostraram que cães assintomáticos possuem maior número de linfócitos T CD8⁺ do que cães sintomáticos e

controles. Além disto, estes autores mostraram que esplenócitos TCD8⁺ de cães assintomáticos apresentam maior resposta antígeno específica *in vitro*, evidenciando a participação desta subpopulação celular na manutenção desta forma clínica e consequentemente na manutenção de um bom equilíbrio na relação parasito/hospedeiro (Reis *et al.*, 2014). Adicionalmente, o aumento de linfócitos T CD8⁺ circulantes em cães vacinados contra LVC tem sido considerado como um marcador de resistência de uma possível infecção por *Leishmania* (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Araujo *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010). Neste sentido, os resultados provenientes da análise do perfil imunofenotípico de linfócitos do sangue periférico possibilitam especular que as imunizações com as vacinas LBSap e Leish-Tec apresentam um perfil associado a proteção contra infecção por *L. infantum*.

O grupo de cães imunizados com a vacina LBSap foi o único a apresentar um aumento na subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ circulantes seis meses após o desafio experimental (T2). Roatt *et al.* (2012) ao estudar cães imunizados com a vacina LBSap também observaram aumento de linfócitos T CD8⁺ circulantes nestes animais após o desafio experimental com *L. infantum* pela via intradérmica. De forma interessante, estudos imunofenotípicos descritos na LVC relataram que o aumento de linfócitos T CD8⁺ está relacionado a um perfil de resposta imune associada à resistência frente à infecção por *L. infantum* (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1994b, Pinelli, 1997, Reis, 2001, Reis *et al.*, 2006b, Reis *et al.*, 2009). Neste sentido, é possível especular que a expansão de linfócitos T CD8⁺ no período de seis meses pós desafio com *L. infantum*, particularmente no grupo imunizado com a vacina LBSap, parece refletir a tentativa do sistema imune em combater um “eventual parasitismo” que possa estar ocorrendo após o desafio experimental. Diferentemente, os demais grupos do nosso estudo não apresentaram aumento nas populações de linfócitos T circulantes (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺) após o desafio intravenoso com *L. infantum*. Resultados semelhantes foram encontrados por Ramos *et al.* (2008) utilizando vacina de DNA para a proteína LACK em cães. Já Borja-Cabrera *et al.* (2008) utilizando a vacina Leishmune[®] em estudo de área endêmica, mostraram que após 18 meses da realização do protocolo vacinal os animais apresentaram aumento, principalmente, da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ e ausência de sinais clínicos aparentes da LVC.

Buscando-se avaliar o perfil de potenciais células apresentadoras de antígenos induzidas durante o processo vacinal, bem como ampliar as investigações dos fatores que poderiam contribuir para a ativação da imunidade adaptativa, o número de

monócitos CD14⁺ circulantes foi estudado nos diferentes grupos vacinais. Neste contexto, foi observado um aumento de monócitos CD14⁺ no grupo LBSap ao final do protocolo vacinal (T1), dado semelhante foi encontrado por Giunchetti *et al.* (2007), ao imunizar cães com a vacina LBSap. De forma semelhante, foi também observado em T1 um aumento de monócitos CD14⁺ nos grupos KMP-11 e Leishmune, sugerindo a capacidade destas vacinas na indução de potenciais APC, expandindo-se em número no sangue periférico dos cães imunizados por estas vacinas. O aumento desta população circulante, após o protocolo de imunizações nestes três grupos específicos, pode estar relacionado a uma possível migração destas células para o local das imunizações, tendo em vista o grande número de animais que apresentaram alterações no local de inoculação das vacinas (7/7 LBSap; 5/7 KMP-11; 6/7 Leishmune), chegando em alguns animais desses grupos a provocar edemas leves. Também foi observado aumento nos linfonodos drenantes (linfonodo periescapular e linfonodo submandibular) dos locais das imunizações (2/7 LBSap; 3/7 KMP-11; 1/7 Leishmune) (dados não mostrados). De fato, Vitoriano-Souza *et al.*, (2008) ao estudar os eventos iniciais da cinética de migração na derme de cães imunizados com LBSap ou a saponina isoladamente, observou um intenso recrutamento celular para o local das inoculações, preferencialmente de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, devido ao adjuvante saponina. Contudo não se sabe o comportamento tardio (15 dias após a inoculação de saponina – T1), após a remissão do nódulo/edema ou fim deste processo inflamatório inicial. Podemos especular que este elevado número de monócitos circulantes poderia estar migrando para a derme e ser uma das principais células envolvidas nos eventos cinéticos tardios de migração e responsável pelos mecanismos celulares envolvidos na diminuição do processo inflamatório local.

O grupo KMP-11 foi o único que apresentou um aumento de monócitos CD14⁺ seis meses após o desafio experimental (T2). Este aumento pode estar relacionado à tentativa do sistema imune dos cães desse grupo em combater o parasitismo da medula óssea, uma vez que este grupo apresentou 5/7 animais positivos neste órgão. Entretanto, apesar deste elevado percentual de positividade, a carga parasitária na medula óssea do grupo KMP-11 foi vinte e uma vezes (21x) menor em comparação com o grupo controle. De fato, Reis *et al.* (2006c) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, categorizados de acordo com a carga parasitária na medula óssea, que os animais que apresentavam baixo parasitismo medular possuíam maiores valores globais de monócitos quando comparados ao grupo de cães com alto parasitismo.

Interessantemente, Guerra *et al.* (2009) relataram em cães naturalmente infectados por *L. infantum* com alta carga parasitária no baço apresentavam diminuição de monócitos CD14⁺ circulantes. Coura-Vital e colaboradores (2011) propuseram uma nova categorização, dentro da forma clínica assintomática na LVC, denominados cães assintomáticos I (CA-I), que são aqueles com sorologia convencional negativa, mas com resultados parasitológicos positivos por métodos moleculares. Interessantemente, alguns cães vacinados com KMP-11 se enquadram neste perfil CA-I (5/7 cães com parasitológico positivo na medula óssea e 2/7 cães com TR DPP[®] positivo), o que poderia justificar o aumento de monócitos CD14⁺ em T2, também observado por Coura-Vital e colaboradores (2011) em animais naturalmente infectados e categorizados como CA-I. Neste sentido, é possível que o aumento desta população celular em cães do grupo KMP11 poderia indicar um fenótipo de resistência após a infecção experimental com *L. infantum*, aumentando a disponibilidade de células apresentadoras de antígenos no sangue periférico, que poderiam estar migrando e combatendo, nos diferentes órgãos, à replicação do parasito de *L. infantum*.

Dessa maneira, observamos que as alterações imunológicas no contexto *ex vivo* apresentadas pelos cães após o protocolo vacinal (T1) e após seis meses do desafio experimental (T2) com as diferentes vacinas sugerem o direcionamento para uma resposta imune protetora na LV. Além disso, a similaridade dos nossos resultados com os estudos vacinais anteriores descritos na literatura, e pelo perfil imunológico evidenciado nos grupos vacinais (aumento de linfócitos T CD3⁺CD8⁺, linfócitos B e monócitos CD14⁺), que justificam o potencial imunoproliférico destas vacinas, reforçam o papel da avaliação imunofenotípica de leucócitos no contexto *ex vivo* em ensaios clínicos vacinais de fase I e II.

A fim de se complementar os estudos relacionados ao perfil imunofenotípico avaliado no contexto *ex vivo* em células circulantes do sangue periférico, foi realizada a análise da resposta imune no contexto *in vitro* nos diferentes grupos experimentais. Esta análise é fundamental para indicação de uma resposta *L. infantum* específica e protetora na LV (White *et al.*, 1992).

Neste sentido, foi realizada análise *in vitro* da capacidade de proliferação dos linfócitos, dos diferentes grupos vacinais, frente ao antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), após o término do protocolo vacinal (T1) e seis meses após o desafio experimental (T2). A análise da atividade linfoproliferativa após as três doses vacinais (T1) entre os diferentes grupos, revelou aumento do índice de proliferação nas culturas

estimuladas com ASLi nos grupos LBSap e Leishmune em relação ao grupo C. Estes resultados indicam o reconhecimento de antígenos (ASLi) relacionados ao agente etiológico da LVC. Desta forma, a identificação de linfócitos responsivos a estes antígenos poderia estar relacionada a uma resposta específica contra uma possível infecção por *L. infantum*, apoiando assim a hipótese destas vacinas (LBSap e Leishmune®) induzirem uma resposta imune contra o agente etiológico da LVC. De forma similar, tem sido mostrado em cães imunizados com uma vacina bivalente composta por antígenos brutos de *Leishmania* proveniente de cepas dermatotrópicas (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) associado ao BCG como adjuvante apresentam maior capacidade linfoproliferativa em resposta ao estímulo com antígenos de *L. infantum* (Giunchetti *et al.*, 2008a). Giunchetti *et al.* (2007, 2008d) também observaram um aumento no índice de proliferação total de cães imunizados com as vacinas LBSap e LBSapSal, quando as culturas eram estimuladas com ASLi ou com o antígeno solúvel de *L. braziliensis*.

Uma segunda abordagem desta análise *in vitro* buscou avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos através do índice de proliferação específicos das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). O grupo LBSap apresentou aumento no índice de proliferação de linfócitos T CD4⁺ específicos em T1, indicando uma possível reconhecimento dessa população celular frente a antígenos do agente etiológico da LVC. Ramos *et al.* (2008) observaram que apenas cães vacinados e que se mantiveram assintomáticos após infecção experimental, apresentaram aumento de linfócitos T CD4⁺, após cultivo *in vitro* de células do linfonodo, confirmando a importância e a participação fundamental dessas células na ativação e elaboração de uma resposta imune efetiva no controle do parasito. Mais recentemente, Fiuza *et al.* (2013) avaliando a resposta imune de cães imunizados com uma vacina com parasitos vivos atenuados de *L. donovani* com deleção no centrin [LdCen (-/-)], tiveram uma resposta linfoproliferativa específicas *in vitro* com aumento de linfócitos T CD4⁺ bem como em linfócitos TCD8⁺ e linfócitos B (CD21⁺). De forma similar aos nossos achados, Fiuza *et al.* (2013) também não observaram aumento na proliferação antígeno-específicas de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de cães imunizados com a vacina Leishmune®. Desta forma, esta proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ frente ao ASLi no grupo LBSap é um bom biomarcador de imunogenicidade protetora na LVC (Reis *et al.*, 2010).

De forma marcante e similar aos achados imunofenotípicos relatados em linfócitos do sangue periférico, foi observado aumento do índice de proliferação de

linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos no grupo LBSap, na presença de ASLi. Similarmente, Giunchetti *et al.* (2007, 2008d) também observaram um aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos nos grupos LBSap e LBSapSal, na presença de ASLi. Evidências experimentais comprovaram que a ativação de linfócitos T CD8⁺ poderia ocorrer a partir de antígenos exógenos fagocitados por APC e apresentados via MHC-I, por um mecanismo denominado de *cross-priming* (Brossart & Bevan, 1997). Este mecanismo explicaria a ativação de linfócitos T CD8⁺ estimulados *in vitro* com antígenos solúveis. Reis *et al.* (2014) mostram maior número de linfócitos T CD8⁺ provenientes do baço de cães assintomáticos após a estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania*, evidenciando a importância desta célula em mecanismos relacionados à resistência a infecção por *L. infantum* em cães. Adicionalmente, no homem e no cão, a infecção assintomática por *L. infantum* tem sido associada à expansão de linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos (Pinelli *et al.*, 1995, Mary *et al.*, 1999).

Interessantemente, o grupo controle apresentou um aumento do índice de proliferação linfocitária em T2 quando comparado ao tempo inicial (T1). A infecção experimental no grupo controle até seis meses após o desafio experimental (T2) tem evoluído de forma assintomática na maioria dos animais (4/7) e, de fato, esta capacidade de estimular a atividade linfoproliferativa pelo reconhecimento a antígenos de *Leishmania*, tem sido associada a um perfil de resposta imune relacionada à resistência contra o desenvolvimento da doença, sendo característico em animais assintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1994b, Solano-Gallego *et al.*, 2000; Reis, 2001). Estudos conduzidos por Lemesre *et al.* (2005) mostraram que o aumento do índice de proliferação celular está diretamente relacionado com a ausência de sinais clínicos da LVC em cães vacinados e desafiados intravenosamente com *L. infantum*.

Roatt *et al.* (2012) estudando cães imunizados com a vacina LBSap observaram um perfil sustentado por até 885 dias após o desafio experimental intradérmico da proliferação celular em CMSP quando estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel, além da redução da carga parasitária no baço destes animais comparados com o grupo controle. Diferentemente, nós não encontramos diferença na atividade linfoproliferativa do grupo LBSap em relação ao grupo controle após o desafio experimental (T2), apesar do valor do índice de proliferação no grupo LBSap ter se mantido sustentado em relação aos tempos antes (T1) e após (T2) o desafio experimental, tendo em vista o aumento do índice de proliferação no grupo controle neste tempo (T2) quando comparado ao tempo

inicial (T1) (conforme discutido anteriormente). Entretanto, o grupo LBSap apresentou um menor valor no índice de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos em T2 quando comparado ao mesmo índice em T1. Com relação a estes resultados, acreditamos que a linfoproliferação no grupo LBSap em T2 tenha sido preferencialmente de linfócitos B, o que justificaria a manutenção do índice de linfoproliferação total em T2, porém diminuição da proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ neste tempo. De fato, Roatt *et al.* (2010) demonstram um aumento na frequência de linfócitos B CD21⁺ específicos *in vitro*, após estimulação com ASLi, em cães imunizados com a vacina LBSap por até 885 dias após o desafio experimental intradérmico. Interessantemente, foi demonstrado, na infecção assintomática por *L. infantum* um aumento de linfócitos B CD21⁺ circulantes (Coura-Vital *et al.*, 2011) bem como no baço (Reis *et al.*, 2014) em relação à forma clínica sintomática.

Nossos resultados reforçam a hipótese que o processo vacinal com LBSap e Leishmune[®] levam à geração de uma resposta imune contra o agente etiológico da LVC compatível com o controle do parasito. Uma vez que após a estimulação *in vitro* com ASLi, houve o aumento da linfoproliferação específica nestes grupos, e, considerando este resultado, essa abordagem pode ser utilizada como um dos principais biomarcadores de resposta imune protetora e indicativo de eficácia/potência vacinal (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008d; Reis *et al.*, 2010).

Diversos estudos têm avaliado a resposta imunológica frente à vacinação contra leishmaniose através da análise multifuncional de células por citometria de fluxo. Com essa abordagem é possível mensurar e identificar potenciais biomarcadores de resistência e/ou susceptibilidade após vacinação e infecção experimental através da análise simultânea ao nível celular (marcadores fenotípicos) e/ou de combinações específicas de respostas funcionais de acordo com o padrão de produção de citocinas empregando para isto um painel de anticorpos monoclonais. Estudos relacionados à avaliação de potenciais candidatos vacinais, avaliando de forma multifuncional células T produtoras de citocinas em modelo murino de leishmaniose, reforçam que esta abordagem de avaliação é um bom preditor de resistência/susceptibilidade na doença (Darrah *et al.*, 2007; Seder *et al.*, 2008). Além disso, diversos trabalhos têm utilizado essa metodologia de forma mais restrita ou ampliada para avaliar o perfil de produção de citocinas na LV humana (Lagler *et al.*, 2002; Hailu *et al.*, 2005) e em estudos vacinais na LVC (Araújo *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011; Fiuza *et al.*, 2013).

A avaliação dos linfócitos T produtores de IFN- γ , através de diferentes metodologias em estudos que buscam investigar a potência de imunobiológicos contra a LV no modelo canino, como um dos principais biomarcadores de proteção vacinal vem sendo realizados (Reis *et al.*, 2010). Tais estudos também foram utilizados na busca de perfis imunológicos de resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania* e tem associado a produção de IFN- γ a cães assintomáticos e de IL-4 a cães sintomáticos (Reis *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010). Em nosso estudo, foi possível avaliar e comparar o perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4 estimulados *in vitro* com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), nos diferentes grupos experimentais após o protocolo de imunizações (T1) e seis meses após o desafio experimental (T2).

Nossos resultados mostraram que a vacina LBSap foi capaz de promover aumento preferencial de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ após as imunizações (T1), e mantendo o nível elevado de produção desta citocina pelos linfócitos T CD8⁺ após o desafio experimental (T2). De fato, Resende *et al.* (2013) observaram em CMSP de cães imunizados com a vacina LBSap a produção das citocinas IL-12, IFN- γ e óxido nítrico, em sobrenadante de culturas estimuladas com ASLi, após o protocolo vacinal bem como após o desafio experimental. Diferente dos nossos achados com a vacina LBSap, a avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos estimulados *in vitro* com SLcA, após a imunização com antígenos brutos de *L. amazonensis* associado ao BCG como adjuvante, estimula um perfil misto de resposta imune, caracterizado pelo aumento simultâneo de IFN- γ e IL-4 em linfócitos T estimulados *in vitro* (Araújo *et al.*, 2008; 2009; 2011). Fiuza e colaboradores (2013) ao avaliarem cães vacinados com LdCen (-/-) observaram *in vitro* um aumento na frequência de linfócitos TCD8⁺ produtores de IFN- γ , além de uma resposta linfoproliferativa com aumento da secreção das citocinas TNF- α e IL-12/IL-23p40, com diminuição da secreção de IL-4. De forma similar aos nossos achados, Fiuza *et al.* (2013) também não observaram diferença na frequência de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores das citocinas IL-4 ou IFN- γ , após a imunização de cães com a vacina Leishmune[®]. Moreno *et al.* (2012) demonstraram que a vacinação em cães com proteínas secretadas e excretadas em meio de cultura de *L. infantum* em associação com o adjuvante QA-21 (LiESP/QA-21) leva a aumento de linfócitos T produtores de IFN- γ , elevando significativamente a capacidade dos macrófagos em reduzir a carga parasitária intracelulares, *in vitro*, após o co-cultivo com os linfócitos autólogos de cães

vacinados, pela indução da via de NOS e produção de derivados de NO. Estes estudos evidenciaram que o IFN- γ é um biomarcador de alta qualidade na identificação de uma vacina imunogênica e protetora contra a infecção por *Leishmania* (Araújo *et al.*, 2008; 2009; 2011; Moreno *et al.*, 2012; Fiuza *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2010).

Nossos resultados no grupo Leish-Tec também demonstraram a capacidade deste imunobiológico em promover aumento de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ após as imunizações (T1). De fato, CMSP de cães imunizados com a vacina Leish-Tec demonstraram ser capazes de aumentar a produção da citocina IFN- γ , em sobrenadante de culturas estimulados com o antígeno rA2 após as imunizações e após o desafio experimental, interessante, em sobrenadante de culturas estimulados com (ASLi) foi também evidenciado a produção de IFN- γ sete meses após o desafio experimental endovenoso (Fernandes *et al.*, 2008).

O grupo KMP-11 apresentou aumento de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em T1 quando comparado a frequência desta população antes do protocolo de imunização. Semelhantemente, Carrilo e colaboradores, avaliando a imunogenicidade da proteína recombinante KMP-11 mostraram que as CMSP de cães experimentalmente infectados foram capazes de proliferarem em resposta a este antígeno recombinante KMP-11, além de aumentar o nível de expressão de mRNA de citocinas como IFN- γ , em contrapartida a baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 produzidas nas CMSP em resposta ao r-KMP-11, sugerindo um perfil de proteção na LVC (Carrilo *et al.*, 2008).

Sabe-se que na LV, seja na doença humana ou canina, a citocina pró-inflamatória IFN- γ estimula aumento da atividade citotóxica de células NK. O desenvolvimento de células Th1, promove a ativação de linfócitos e a atividade microbicida de macrófagos contra os parasitos através da produção de peróxido de hidrogênio e/ou óxido nítrico (NO) (Badaró *et al.*, 1990; Reis *et al.*, 2009; Carrillo & Moreno, 2009; Maia & Campino, 2012; Bhattacharya & Ali, 2013). Boggiato *et al.* (2010) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e assintomáticos, aumento de IFN- γ após estimulação antígeno específico em CMSP destes animais quando comparado a animais sintomáticos. Na LVH, Hailu *et al.* (2005) demonstraram aumento de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ principalmente em pacientes curados submetidos a quimioterapia convencional com glucantime e pacientes com a forma assintomática da doença.

É importante ressaltar que não foram evidenciadas alterações significativas na produção intracitoplasmática da citocina IL-4 nos linfócitos T CD8⁺ entre nenhum dos grupos nos diferentes tempos avaliados. Lagler *et al.* (2002), avaliando um paciente com LV sintomática, mostraram que o aumento de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺ é um dos principais biomarcadores em relação à doença ativa.

Entretanto, para linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 foi observado um aumento deste perfil celular após o desafio experimental (T2) nos grupos Leish-Tec, KMP-11 e controle. A citocina IL-4 parece estar associada à susceptibilidade na doença humana, entretanto, na LVC seu papel ainda parece controverso (Quinnell *et al.*, 2001; Sacks & Noben-Trauth, 2002). Sugere-se que a citocina IL-4 age inibindo a transdução de sinais para a enzima iNOS reduzindo assim a produção de NO pelos macrófagos. Além disso, o aumento desta citocina está associado a complicações em pacientes apresentando a LV ativa e na leishmaniose dérmica pós Calazar (Kemp *et al.*, 1993), sendo a redução de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ na LVH, associado como um dos principais achados em pacientes com perfil de resistência na doença (Hailu *et al.*, 2005).

Nossos resultados reforçam a hipótese que o processo vacinal, principalmente, com a vacina LBSap levam à geração de uma resposta imune protetora contra o agente etiológico da LVC compatível com o controle do parasito. Uma vez que após a estimulação *in vitro* com ASLi, houve o aumento preferencial de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺, sem aumento na produção da citocina IL-4 por estas células após o desafio experimental.

A resposta imune humoral anti-*Leishmania* na LVC é caracterizada por elevados níveis de IgG total, IgG1 ou IgG2, que não impedem a evolução da doença (Deplazes *et al.*, 1995, Morales *et al.*, 1997, Bourdoiseau *et al.*, 1997a, Cavaliero *et al.*, 1999, Nieto *et al.*, 1999, Boceta *et al.*, 2000, Solano-Gallego *et al.*, 2000, Leandro *et al.*, 2001, Solano-Gallego *et al.*, 2001, Fernandez-Perez *et al.*, 2003, Oliveira-Mendes *et al.*, 2003, Quinnell *et al.*, 2003, Almeida *et al.*, 2005, Iniesta *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006c, Cardoso *et al.*, 2007, de Andrade *et al.*, 2007, Day, 2007; Reis *et al.*, 2009). Embora a produção de uma resposta imune humoral não seja diretamente relacionada com proteção derivada da vacinação anti-*Leishmania*, alguns estudos têm proposto a análise de IgG Total e de seus isotipos (IgG1 e IgG2) como biomarcadores imunológicos complementares (Reis *et al.*, 2010). Considerando que as respostas IgG1 e IgG2 são em grande parte dependentes (originárias) da produção de citocinas por linfócitos T e outras populações celulares, a avaliação de isotipos anti-*Leishmania* têm

sido usada, em geral, para a avaliação indireta da imunidade em cães (Fujiwara *et al.*, 2005). A utilização desses marcadores nos estudos imunopatológicos ou em ensaios de imunogenicidade de vacinas contra LVC é duvidosa e controversa, sobretudo na avaliação de resistência/suscetibilidade à doença. Uma vez que para identificação das subclasses IgG1 e IgG2 vem sendo utilizado anticorpos policlonais que não são subclasse específicos (Day *et al.*, 2007). Além disto, até o momento, ainda não se identificou nenhuma correlação entre perfis de citocinas *versus* subclasses de IgG na LVC de modo a prever perfis de resistência e suscetibilidade à doença e mesmo proteção vacinal. Mediante o exposto, devido a subjetividade dos resultados da resposta imune humoral anti-*Leishmania* como biomarcador de imunogenicidade vacinal na LVC, não foi preconizado neste estudo a avaliação dos níveis séricos das subclasses de IgG (IgG1 ou IgG2), através da Elisa *in house* utilizando o ASLi, como preconizado por diferentes autores (Giunchetti *et al.*, 2007; 2008d; Roatt *et al.*, 2010; Aguiar-Soares, *et al.*, 2014).

Entretanto, com intuito de atender a IN-31 do MS (MS, 2007) para testes de vacinas anti-LVC, que preconiza a identificação de métodos para distinguir entre infecção natural pela *Leishmania infantum* e a resposta imune frente ao produto vacinal, realizamos a avaliação da reatividade sérica de IgG total pelo ensaio imunoenzimático (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]), além do teste imunocromatográfico rápido (TR DPP[®] – Bio-Manguinhos[®]), ambos os testes sorológicos são preconizados e utilizados pelo MS no PVCLV.

A avaliação da reatividade de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* (EIE[®] – Bio-Manguinhos[®]) no soro de cães, quinze dias após as três imunizações (T1) e seis meses após o desafio experimental (T2), demonstraram aumento na média da densidade ótica dos grupos LBSap, Leishmune e KMP-11 acima do limiar de positividade.

Em estudos prévios, realizados por Giunchetti *et al.* (2007; 2008c) demonstraram pela técnica de ELISA (utilizando ASLi como antígeno *in house*) que a vacinação com os imunobiológicos LBSap e LBSapSal induzem elevados níveis de IgG Total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*. Além disso, Roatt *et al.* (2012) e Aguiar-Soares, *et al.* (2014) demonstram que por até 885 dias após o desafio experimental intradérmico, cães imunizados com LBSap e LBSapSal, apresentam níveis elevados de IgG Total anti-*Leishmania*. No caso das vacinas LBSap que são constituídas por antígenos heterólogos de *L. braziliensis*, os animais doentes podem ser distinguidos dos vacinados

por vários métodos como ELISA ou imunocromatografia rk39 ou citometria de fluxo (Lemos *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2007, 2009).

Da mesma forma, a soroconversão após a vacinação de cães com Leishmune[®] foi relatada por diferentes autores (de Amorim *et al.*, 2010; Marcondes *et al.*, 2011; Fiuza *et al.*, 2013), utilizando ASLi como antígeno, através da técnica de ELISA *in house*. Fernandes *et al.*, (2014) através da técnica de ELISA, utilizando também antígeno *in house* extraído de *L. infantum*, demonstrou uma queda na média do título dos anticorpos nos grupos vacinados com Leishmune[®] e Leish-Tec[®], noventa dias após o final do protocolo vacinal, com valores da média da densidade óptica, dos dois grupos, abaixo do *cut-off* da reação sorológica. Ao final dos 11 meses de acompanhamento dos cães na área endêmica, 32.5% (13/40) e 30.9% (13/42) dos cães imunizados com as vacinas Leishmune[®] e Leish-Tec[®], respectivamente, apresentavam sorologia positiva, além de PCR no baço positiva.

Nossos resultados no grupo Leish-Tec[®], diferem dos resultados obtidos por Fernandes *et al.* (2014) em cães imunizados com a vacina Leish-Tec[®] pertencentes a uma área endêmica para LVC. Entretanto, são similares ao ensaio clínico vacinal de fase I e II da vacina Leish-Tec[®], onde não foi observado soroconversão dos cães, durante e após as três doses vacinais com Leish-Tec[®], mas sim, apenas após seis meses do desafio experimental endovenoso, através da técnica de ELISA *in house*, utilizando ASLi como antígeno.

Com relação ao elevado número de cães do grupo KMP-11 com sorologia positiva no EIE[®], tem sido descrito na literatura, o reconhecimento específico do antígeno rKMP-11 por ELISA pelo soro de camundongos, cães e humanos infectados por *Leishmania* (Iniesta *et al.*, 2007; Bhaumik *et al.*, 2009; Carrilo *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 1998).

No contexto da imunogenicidade de vacinas, alguns pesquisadores admitem que uma vacina contra leishmaniose visceral não deva ser anticorogênica, considerando que a resposta imune contra o parasito é basicamente celular. Keenan *et al.* (1984a,b) preconizaram que embora a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* não fosse suficiente para promover a proteção e impedir a evolução da doença, a mesma também não aconteceria na ausência de anticorpos. De alguma maneira, é possível que pelo menos no início do processo infeccioso as Ig(s) possam ter ação efetora contra as promastigotas inoculadas na derme. De fato o papel das Ig(s) na resposta imune contra

parasitos intracelulares basicamente de macrófagos após o desafio vacinal é pouco conhecido e necessita de esclarecimentos.

Desta maneira geral, nossos resultados indicam que grande parte dos cães imunizados nos diferentes grupos (exceto Leish-Tec) tornam-se sorologicamente positivo no diagnosticado pelo EIE[®] após o protocolo de imunização. Como discutido anteriormente, a eutanásia de cães soropositivos é uma das principais recomendações das autoridades de saúde pública para controlar a LV em áreas endêmicas no Brasil. Consequentemente, os animais vacinados que se tornam sorologicamente positivos podem ser erroneamente eutanasiados. Portanto, um dos principais problemas da vacinação é a indução de anticorpos que reagem com os principais antígenos de *Leishmania* empregados nos testes sorológicos. Neste sentido, diversos autores têm buscado melhores antígenos (da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Pedras *et al.*, 2008; Lemos *et al.*, 2008; de Lima *et al.*, 2010; Quinell *et al.*, 2013) ou diferentes metodologias sorológicas (Burns-Jr *et al.*, 1993; Lira *et al.*, 2006; Coura-Vital *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2009; Ker *et al.*, 2013), com o intuito de melhorar os índices de especificidade e sensibilidade, além da tentativa de discriminar cães vacinados, tendo em vista que esta diferenciação é de fundamental importância para a distinção de cães doentes dos vacinados, se tornando inclusive uma exigência da IN-31 do MS (MS/Brasil, 2005, 2007, 2009) a ser cumprida pelas vacinas anti-LVC disponíveis no mercado.

Neste sentido, o TR DPP[®] preconizado pelo MS é uma inovadora tecnologia de imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte-americana Chembio e transferida para a empresa nacional, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. O TR DPP[®] é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos K 26, K 39 e K9) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani* e *L. infantum*). O RT DPP[®] é caracterizado por ser rápido, pois o resultado é conhecido após 15 minutos da coleta da amostra biológica (soro, plasma e sangue total), é de fácil manipulação, pois não precisa de pessoa especializada para a sua execução, nesse sentido, tem sido utilizado no PCLVC como teste de triagem sorológica nas áreas endêmicas para LV.

Nossos resultados empregando o TR DPP[®] demonstraram que nenhum dos cães, dos diferentes grupos vacinais do estudo, quinze dias após a terceira dose vacinal,

apresentaram resultado positivo para o teste, demonstrando a distinção de cães doentes dos vacinados. Diferentemente, Marcondes *et al.* (2013) analisando 18 cães imunizados com Leishmune[®] e avaliando a sorologia através do EIE[®] e TR DPP[®] observou uma proporção de positividade nos cães de 83,3% e 33,3%, respectivamente, em 90 dias após a primeira dose vacinal, e uma queda para 33,3% e 11,1%, respectivamente, em 180 dias após a primeira dose vacinal.

No presente estudo, foi possível detectar cães positivos no TR DPP[®], apenas seis meses após o desafio experimental endovenoso (T2), e foram concordantes com os resultados da EIE[®], com exceção, de um cão no grupo controle que apresentou resultado positivo para o TR DPP[®], mas negativo no EIE[®]. Esta não concordância entre as metodologias sorológicas empregadas e, principalmente, em relação aos achados parasitológicos na medula óssea, pode ser justificada pelas diferenças de sensibilidade e especificidade das diferentes metodologias e devido à própria natureza do estudo (ensaio clínico vacinal). Neste sentido, no nosso estudo (ensaio clínico vacinal) os cães foram imunizados com diferentes repertórios antigênicos que promoveram diferentes alterações imunológicas, como discutido anteriormente. Além disso, provavelmente, o tipo de desafio experimental utilizado está influenciando nesta discrepância entre a sorologia e os resultados parasitológicos encontrados. O órgão alvo escolhido pelo estudo (medula óssea) também pode estar influenciando nesta não concordância entre a sorologia e o parasitismo, tendo em vista os achados imunológicos dos diferentes grupos vacinais que podem atuar numa possível flutuação do parasitismo nos diferentes órgãos bem como na medula óssea. Interessantemente, Coura-Vital e colaboradores (2011) têm chamado a atenção para uma nova categorização da forma clínica assintomática, AS-I, de cães sem sinais clínicos aparentes da doença e sorologia negativa, mas que apresentam resultados parasitológicos moleculares positivos.

Diferenças entre o desafio experimental e o natural como: número de parasitos, estágio do ciclo de vida (amastigota ou promastigota), via de infecção, presença ou não de saliva do vetor, dentre outras são variáveis importantes que devem ser levadas em consideração quando a infecção experimental é realizada em potenciais candidatos a uma vacina anti-LVC (Reis *et al.*, 2010). O desafio experimental pela via endovenosa com alto número de parasitos (10^7 - 10^8 promastigotas) parece ser o modelo de desafio mais eficiente em cães, pois promove o estabelecimento de infecções rápidas, facilitando o estudo do curso da doença, sendo este apropriado também para avaliar eficácia de drogas e também a eficácia de vacinas (Genaro,1993; Ramos *et al.*, 2008;

Fernandes et al., 2008; Reis *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2012). Entretanto, este tipo de desafio experimental pode ocultar a real eficácia vacinal, devido a possibilidade da infecção/desafio suprimir uma resposta de proteção que poderia estar presente em cães vacinados (Poot *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2008, 2009). No nosso estudo foi empregado o desafio experimental por via intravenosa com 5×10^7 promastigotas, pois desejávamos uma evolução mais rápida da doença, a fim de identificar de forma mais rápida o melhor protótipo/candidato vacinal para ser testado em ensaios clínicos de fase III em áreas endêmicas (Genaro, 1992; Moreno et al., 2007; Reis *et al.*, 2010). Diferentemente, o desafio experimental intradérmico busca mimetizar o local de inoculação dos flebotomíneos (Roatt *et al.*, 2010; Aguiar-Soares, *et al.*, 2014) e leva a uma infecção experimental mais branda e de evolução clínica assintomática e lenta (Santos-Gomes *et al.*, 2001; Paranhos-Silva *et al.* 2003; Roatt *et al.*, 2010; Aguiar-Soares, *et al.*, 2014). Já o desafio intravenoso não passa por uma série de etapas imunológicas de apresentação e reconhecimento antigênico que ocorrem na derme. Entretanto, infecção/desafio na “ponta da probócida” de flebotomíneos infectados ainda é um obstáculo a ser alcançado principalmente quando se trata do modelo cão.

O desafio experimental proposto pela via intravenosa induziu o desenvolvimento de uma infecção assintomática na maioria dos cães dos diferentes grupos durante os seis meses de acompanhamento após o desafio experimental (T2), tornando importante um maior tempo de acompanhamento dos animais. O grupo controle apresentou um maior número de animais (3/7) com sinais/sintomas da doença, sendo que estes animais apresentaram pelo menos dois sinais clínicos compatíveis com a doença. Além disso, os animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos mais exuberantes da LVC, como: emagrecimento, lesão no focinho, despigmentação da mucosa, linfadenopatia, apatia, conjuntivite, perda de pêlo. Estes resultados comprovam o sucesso do desafio experimental, que é um dos mais importantes quesitos para avaliação da potência/eficácia em ensaios clínicos vacinais de Fase II.

Em estudos com cães naturalmente infectados indicam que a doença pode apresentar período pré patentes mais longos que 16 meses, e até mesmo, nem apresentar sinais clínicos da LVC (Adler & Theodor, 1932; Abranches *et al.*, 1991). Na verdade, pouco se sabe sobre a dinâmica natural da infecção por *L. infantum* em cães. Sabe-se que baixo número de parasitos (10-1.000) são injetados pela via intradérmica, durante um ou, provavelmente, repetidas inoculações, e que o estado nutricional e doenças concomitantes podem afetar o curso da infecção (Warburg & Schlein, 1986). Sob tais

condições variáveis, um período pré patente de cerca de 110 dias até o aparecimento de resultados positivos na sorologia anti-*Leishmania* foi estimado por Quinnel *et al.* (1997). Entretanto, a determinação do período pré patente em animais naturalmente infectados é extremamente imprecisa tendo sido relatada até 33 meses para que ocorra a presença do parasito na medula óssea (Longstaffe *et al.*, 1983). Além disto, alguns animais naturalmente infectados nunca convertem a sorologia anti-*Leishmania*, e mesmo após 20 meses de infecção, apenas metade dos animais sorologicamente positivos desenvolvem sinais clínicos da doença (Hommel *et al.*, 1995).

A avaliação do estado clínico como uma abordagem para acessar a eficácia vacinal não deve ser recomendada unicamente, devido à subjetividade e inespecificidade desta prática. Cabe ressaltar do grande número de animais assintomáticos que são fonte de infecção para flebotomíneos e que escapariam das avaliações clínicas sendo então considerados animais protegidos pela vacina (Molina *et al.*, 1994, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006^a, Quinnell & Countenay, 2009; Laurenti *et al.*, 2013). Nesse sentido foram realizadas as análises hematológicas e bioquímicas, além do parasitismo medular, para compor as análises da potência vacinal.

As alterações hematológicas e bioquímicas séricas após o desafio experimental em cães imunizados servem como biomarcadores de monitoração do diagnóstico e prognóstico da evolução do quadro clínico na doença. Estas avaliações são de extrema importância seja em ensaios clínicos vacinais ou na historia natural de desenvolvimento da LVC ou humana. Embora, a avaliação do quadro hematológico forneça pouco valor para o diagnóstico na LVC ou LVH, estes parâmetros apresentam relevância no acompanhamento do estado clínico, com um forte valor prognóstico, sendo importantes parâmetros na doença humana de definição de condutas terapêuticas em protocolos de consenso médico, algoritmos de conduta clínica, como apresentados nos manuais de formas graves da LV e de Leishmaniose/HIV do Ministério da Saúde (Nasir *et al.*, 1995; MS 2006a, 2006b; Reis *et al.*, 2006a; Reis *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; MS, 2011).

Uma grande dificuldade na observação e análise dos parâmetros hematológicos na LVC está na padronização de valores de referência para cães em relação a grupos controles não infectados. Neste sentido, a fim de estabelecer valores de referências mais próximos da realidade, uma estratégia utilizada em nosso estudo foi avaliar todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos em um grupo de 45 cães saudáveis e não infectados. Esta análise nos possibilitou comparar de forma mais segura os achados

laboratoriais. Em relação ao leucograma, apenas foi observado que alguns cães do controle apresentavam valores da população global de leucócitos abaixo dos valores de referência, principalmente, relacionado a uma diminuição do valor absoluto de neutrófilos neste mesmo tempo (T2). Reis *et al.*, (2006b) avaliaram o quadro bioquímico/hematológico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas da LVC, e observaram que cães sintomáticos apresentavam leucopenia (Reis *et al.*, 2006b).

Na LVC na forma clínica sintomática é comum o aparecimento do quadro hematológico anemia normocítica e normocrômica. da Costa-Val *et al.* (2007), relataram em seu estudo que 42% dos cães avaliados apresentaram anemia normocítica normocrômica e não regenerativa. Estes dados coincidem com os descritos em outros trabalhos que apontam a anemia normocítica e normocrômica como um achado comum na LVC ativa (Ciaramella *et al.*, 1997; Feitosa *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2006a; Freitas *et al.*, 2012). Entretanto, os animais dos diferentes grupos experimentais não apresentaram alterações no eritrograma, muito provavelmente, por grande parte apresentar a forma clínica assintomática da doença. A plaquetopenia é uma característica marcante em animais sintomáticos, entretanto, o grupo Leish-Tec apresentou cães com a contagem de plaquetas abaixo dos valores de referência. Cortese *et al.*, (2006) sugerem que as desordens de coagulação observadas em cães com LVC, possam ser devido ao quadro mais grave da doença, onde ocorre a queda na contagem total de plaquetas e dos níveis dos fatores de agregação plaquetários.

Nas análises bioquímicas (Função hepática, renal e proteinograma) não foi possível evidenciar diferença entre os diferentes grupos experimentais, apenas foram observadas em alguns animais variações pontuais, fora dos valores de referência, dentro de alguns dos parâmetros avaliados no estudo, mas que não foram capazes, na maioria das vezes, de alterar a média dos grupos para fora dos valores de referência. O grupo controle foi o único que apresentou a média dos valores acima dos valores de referência, essa variação ocorreu nas dosagens das enzimas aminotransferases séricas (ALT/TGP e AST/TGO). As alterações nas concentrações dessas enzimas são consideradas importantes biomarcadores de lesões nas células hepáticas. É sabido que na LVC os parasitos podem provocar lesões hepáticas, induzindo alterações na morfologia dos hepatócitos (hiperplasia e hipertrofia) e conseqüentemente no metabolismo do órgão. Giunchetti *et al.* (2008b) observaram e demonstraram a presença de hiperemia e congestão no fígado de cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Além disso, observaram aumento relativo do órgão quando comparado a cães não infectados, sugerindo hepatomegalia (Giunchetti *et al.*, 2008b). Entretanto, as hepatopatias associadas à LVC, bem como hepatomegalias são pouco frequentes (Alvar *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Até o momento, não há um consenso entre os grupos de pesquisas que desenvolvem vacinas anti-LVC sobre qual(is) a(s) melhor(es) ferramenta(s) diagnóstica(s) para avaliação de proteção em vacinas, bem como se o uso de uma associação de técnicas (imunológicas e parasitológicas) seria a melhor alternativa, assim como qual seria o melhor órgão a ser avaliado (Reis *et al.*, 2010). Devido a isso, a IN-31 deixa em aberto para no ensaio clínico vacinal de fase II ser definido: qual a metodologia que será utilizada para aferir a potência do produto e a eficácia vacinal, incluindo o teste desafio ou metodologia equivalente; além de definir um método para avaliar a transmissão do parasito para o vetor.

Nossa razão para a escolha da medula óssea para detecção do parasito foi baseada na boa sensibilidade diagnóstica desse órgão comparada, por exemplo, ao sangue e CMSP na realização da PCR. Além do fácil acesso na coleta do material biológico em comparação, por exemplo, ao baço e fígado que necessitam de equipamentos de imagem como o ultra-som (Reis *et al.*, 2009). A presença do parasito na medula óssea dos cães imunizados e desafiados foi investigada por meio da mielocultura em NNN/LIT, bem como através do diagnóstico molecular por qPCR.

Embora o isolamento de promastigotas de *Leishmania* sp. em cultura (mielocultura) seja considerado padrão ouro no diagnóstico parasitológico da infecção por *Leishmania* (100% específico), a sensibilidade deste método é variável e proporcional à carga parasitária do animal. Além disso, necessita de pessoal altamente qualificado e treinado, e as chances de contaminação são muito grandes.

A técnica de qPCR em tempo real vem sendo utilizada por vários pesquisadores e tem se tornado nos últimos anos uma ferramenta de fundamental importância na biologia molecular para diagnosticar/monitorar a evolução da LV. Através da quantificação da carga parasitária tecidual, esta metodologia vem substituindo gradativamente outras técnicas parasitológicas como a PCR convencional, por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade (Bretagne *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2006). Para a quantificação da carga parasitária nos diferentes tecidos, utilizamos curvas-padrão construídas a partir de concentrações conhecidas do DNA de *L. infantum*,

que é uma das maneiras mais eficientes de se analisar os resultados obtidos pela qPCR (Cikos *et al.*, 2007).

Por ser uma técnica relativamente nova, a literatura ainda é escassa em trabalhos que avaliaram o uso da qPCR em ensaios clínicos vacinais (Roatt *et al.*, 2012, Aguiar-Soares *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, foi observada redução considerável da carga parasitária da medula óssea no grupo de cães imunizados com LBSap quando comparado à carga no grupo controle, chegando a uma redução de 47 vezes. Se analisarmos comparativamente os dois protótipos vacinais em relação à carga parasitária, a vacina LBSap apresentou o melhor desempenho em reduzir a carga parasitária e com um menor número de animais positivos, apesar de não encontrarmos diferença estatística da carga parasitária entre os dois grupos. Semelhante à baixa carga parasitária encontrada em nosso estudo, no grupo de cães imunizados com a vacina LBSap, Roatt *et al.* (2012) e Aguiar-Soares *et al.* (2014) ao analisarem a carga parasitária no baço de cães vacinados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente, observaram uma diminuição da carga por qPCR em relação ao grupo controle. Os grupos experimentais Leishmune e Leish-Tec também apresentaram uma menor carga na medula óssea comparada ao grupo controle.

De forma interessante, as duas técnicas empregadas (mielocultura e qPCR) tiveram a mesma sensibilidade na identificação do parasito e de seu DNA na medula óssea durante o acompanhamento de seis meses após o desafio experimental (T2). De fato, os resultados obtidos com o uso do isolamento de parasitos por meio do cultivo *in vitro* em ensaios clínicos vacinais que utilizaram o desafio por via endovenosa, sugerem o emprego da cultura em meio NNN/LIT como uma ferramenta diagnóstica adicional e útil na avaliação de potenciais imunobiológicos no modelo canino (Mayrink *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 2008; Carcelén *et al.*, 2009).

Na avaliação da vacina composta pela proteína recombinante A2 (Leish-Tec[®] – Hertape Calier Saúde Animal S/A), Fernandes *et al.* (2008) ao desafiarem experimentalmente cães beagles com 5×10^7 promastigotas em fase estacionária (cepa BH400 (MCAN/BR/2000/BH400) por via intravenosa demonstraram altas taxas de detecção do parasito em isolamento de medula óssea com percentual de positividade em torno de 78,5% (11/14 cães) empregados no estudo, com 4/7 animais do grupo imunizados com Leish-Tec[®] positivos na mielocultura. Resultados semelhantes foram observados por Carcelén *et al.* (2009) utilizando isolamento do parasito em meio de cultura de material obtido do baço em cães imunizados com uma vacina composta pela

proteína quimérica Q e desafiados por via endovenosa com 5×10^5 promastigotas de *L. infantum*, demonstrando taxas de detecção em torno de 72% (15/21 cães).

Nosso estudo empregou diferentes ferramentas e abordagens na busca racional da inocuidade, imunogenicidade e potência de candidatos vacinais em um ensaio clínico vacinal de fase I e II. Além disto, o desenho experimental do presente estudo possibilitou a avaliação de forma simultânea de quatro vacinas no modelo canino, otimizando tempo e animais de experimentação.

As quatro vacinas testadas foram consideradas inócuas e seguras. Os quatro grupos vacinais apresentaram o quadro clínico e parâmetros hemato-bioquímicos muito semelhantes. Na avaliação da imunogenicidade vacinal ambas as vacinas apresentaram perfis imunológicos coniventes com a proteção frente à doença, entretanto, sendo que a vacina LBSap apresentou um maior número de evidências e achados experimentais compatíveis com uma possível ação contra o parasito de *L. infantum*. A avaliação da potência vacinal, principalmente, através da carga parasitária na medula óssea forneceu um bom panorama de um perfil associado ao controle do parasitismo em todas as vacinas testadas. Dentre os dois protótipos vacinais testados, LBSap e KMP-11, a vacina LBSap apresentou melhor perfil de imunogenicidade e potência vacinal, condizente para com a continuação dos estudos clínicos vacinais de fase III. Os avanços científicos obtidos neste campo representam não só um passo significativo para os ensaios clínicos em vacinas, contra LVC, mas sem dúvida também, um passo decisivo na obtenção de uma possível vacina para leishmaniose visceral canina que certamente irá fortalecer as medidas de controle do PVCLV em um futuro próximo.

8. Conclusão

Os resultados obtidos neste ensaio clínico de Fase I e II mostraram que as vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] não induzem alterações adversas que contraindicariam seu uso. Além disto, os resultados da avaliação dos aspectos relacionados à imunogenicidade obtidos pela imunização com os protótipos vacinais LBSap e KMP-11 bem como os imunobiológicos Leishmune[®] e Leish-Tec[®] indicam o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção por *L. infantum* e conseqüentemente na prevenção da LVC. Já a análise da potência/eficácia vacinal demonstrou que todas as vacinas testadas LBSap, KMP-11, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] foram capazes de reduzir carga parasitária seis meses após o desafio experimental, evidenciando que a imunogenicidade destas vacinas desencadearam mecanismos de proteção frente a infecção por *L. infantum*. A vacina LBSap, destacou-se em relação a imunogenicidade e potencia por apresentar o melhor perfil imunológico bem como menor carga parasitária na medula óssea em comparação com as outras vacinas. O conjunto de resultados obtidos neste estudo indica uma boa capacidade imunogênica e protetora das vacinas testadas, em especial a vacina LBSap por apresentar melhor desempenho nos testes. Desta forma, a vacina LBSap pode ser considerada um excelente candidato vacinal a prosseguir em ensaios clínicos de Fase III duplo-cego randomizado em áreas de alta endemicidade para leishmaniose visceral canina afim de avaliar sua eficácia neste cenário.

9. Perspectivas

A partir da realização deste trabalho foi possível obter resultados promissores no âmbito da imunogenicidade e potência vacinal com os diferentes imunobiológicos testados contra a leishmaniose visceral. Além disso, com os resultados obtidos em nosso estudo foi possível agregar novas perspectivas que contribuirão para ampliar o conhecimento em ensaios clínicos vacinais no modelo canino. Neste sentido, a continuidade desse trabalho tem como principais perspectivas avaliar:

- A produção de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-6, TGF- β , TNF- α e IL-10) em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos diferentes grupos bem como a dosagem dos níveis de óxido nítrico;
- A resposta imune compartimentalizada (baço, fígado, pele e linfonodo) por PCR em tempo real afim de avaliarmos a expressão de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, TGF- β), quimiocinas (RANTES, MIP-1 α , CCL2, CCL4, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24, CXCL8, CXCL9, CXCL10), iNOS e receptores do tipo *Toll* (TLR2, TLR4, TLR9);
- A carga parasitária no baço, fígado, pele, linfonodo e medula óssea por PCR em tempo real, doze meses após o desafio experimental;
- A transmissão do parasito para flebotomíneos e a carga parasitária nas fêmeas alimentadas (xenodiagnóstico), doze meses após o desafio experimental;
- O perfil de resposta imune doze meses após o desafio experimental através das abordagens *ex-vivo* (imunofenotipagem do sangue periférico; sorologia anti-*Leishmania*, etc.) e *in vitro* (linfoproliferação específica; perfil de IFN- γ e IL-4 intracitoplasmático em linfócitos);
- A capacidade microbicida de macrófagos caninos isolados ou em co-cultivo com linfócitos T (CD4⁺ e/ou CD8⁺) infectados *in vitro* com promastigotas de *L.infantum*;

Dessa maneira, comprovado o sucesso profilático da vacina LBSap em ensaio clínico de Fase I e II, torna-se altamente relevante propor a realização de um ensaio

clínico de fase III em área endêmica de alta prevalência para LVC com este imunobiológico para a real análise de sua eficácia e proteção contra a leishmaniose visceral canina bem como possível ação na diminuição da incidência da leishmaniose visceral humana.

10. Referências Bibliográficas

- AGUIAR-SOARES, R.D., ROATT B.M., KER, H.G., MOREIRA, N.D, MATHIAS, F.A, CARDOSO, J.M, GONTIJO, N.F, BRUNA-ROMERO, O., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., CORRÊA-OLIVEIRA, R., GIUNCHETTI, R.C., REIS, A.B. (2014) LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors*. Feb 7;7(1):61.
- AHMED, S.B., BAHLOUL, C., ROBBANA C., ASKRI, S., DELLAGI, K. (2004). A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine due to *L. major*. *Vaccine*;22(13—14):1631—9.
- ALARCON, J. B., WAINE, G. W. AND MCMANUS, D. P. (1999). DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Advances in Parasitology* 42, 343–410.
- ALEXANDER, J., COOMBS, G.H, MOTTRAM, J.C. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a TH1 response. *J Immunol*;161:6794—801.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., & NIETO, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1-88.
- ALVES, C.F. ET AL. (2009) 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.* 128, 349–358.
- ANDERSON, J.M., OLIVEIRA, F., KAMHAWI, S. et al. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*;7:52.
- ANDRADE, A.M. (2008) A descriptive profile of the canine population in Araçatuba, São Paulo State, Brazil, from 1994 to 2004]. *Cad. Saúde Pública* 24, 927–932.
- ARAÚJO, M.S. ET AL. (2008) Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 2211–2224.
- ARAÚJO, M.S. ET AL. (2009) 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* 27, 1008–1017.
- ARAÚJO MS, DE ANDRADE RA, SATHLER-AVELAR R, MAGALHÃES CP, CARVALHO AT, ANDRADE MC, CAMPOLINA SS, MELLO MN, VIANNA LR, MAYRINK W, REIS AB, MALAQUIAS LC, ROCHA LM, MARTINS-FILHO OA. (2011). Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *May 15*;141(1-2):64-75.
- ARIAS JR, MONTEIRO PS, ZICKER F. (1996). The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Pan American Health Organization, Brasilia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 1996 Apr-Jun;2(2):145-6.
- ASHFORD, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J.Parasitol.* 30, 1269-1281.
- BACON KM, HOTEZ PJ, KRUCHTEN SD, KAMHAWI S, BOTTAZZI ME, VALENZUELA JG, LEE BY. 2013. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine.* Jan 7;31(3):480-6

- BADARÓ R, JONES TC, LORENÇO R, CERF BJ, SAMPAIO D, CARVALHO EM, ROCHA H, TEIXEIRA R, JOHNSON WD JR. (1986^a). A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis.* 1986 Oct;154(4):639-49.
- BADARO R, JONES TC, CARVALHO EM, SAMPAIO D, REED SG, BARRAL A, TEIXEIRA R, JOHNSON WD JR. (1986^b). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986 Dec;154(6):1003-11.
- BANETH, G. & SHAW, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*,106, 315-324.
- BARATA RA, PEIXOTO JC, TANURE A, GOMES ME, APOLINÁRIO EC, BODEVAN EC, DE ARAÚJO HS, DIAS ES, PINHEIRO ADA C. (2013). Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in minas gerais state, Brazil. *Biomed Res Int.* 2013;2013:405083.
- BHAUMIK ET AL., (2009). KMP11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but request exogenous IL-12 as and adjuvant for comparable protection against *L. major*. *Vaccine* 27, 1306-1316
- BONGIORNO G, PAPARCONI R, MANZILLO VF, OLIVA G, CUISINIER AM, GRADONI L. (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (Canileish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs-A preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol.* May 17
- BORJA CABRERA, G.P., DA SILVA, V.O., DA COSTA, R.T., REIS, A.B., MAYRINK, W., GENARO, O., et al. (1999). The FML-ELISA assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med*;61(2):296—301.
- BORJA-CABRERA G.P. (2000). Análise do potencial diagnóstico, prognóstico e imunoprotetor do antígeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania (L.) donovani*, no calazar canino experimental e de área endêmica. PhD thesis. Universidade Federal Fluminense. pp. 81—98.
- BORJA-CABRERA, G. P., CORREIA PONTES, N. N., DA, S., V, PARAGUAI DE, S. E., SANTOS, W. R., GOMES, E. M., LUZ, K. G., PALATNIK, M., & PALATNIK DE SOUSA, C. B. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-3284.
- BORJA-CABRERA, G.P. ET AL. (2008) Immunogenicity assay of the mLeishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 26, 4991-4997.
- BOURDOISEAU, G., HUGNET, C., GONÇALVES, R.B., VÉZILIER, F., PETIT-DIDIER, E., PAPIEROK, G., LEMESRE, J.L. (2009). Effective humoral and cellular immunoprotective responses in LiESAp-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* Mar 15;128(1-3):71-8. Epub 2008 Oct 17. PubMed PMID: 19046774.
- BRAGA, M. D., COELHO, I. C., POMPEU, M. M., EVANS, T. G., MACAULLIFE, I. T., TEIXEIRA, M. J., & LIMA, J. W. (1998). Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 419-424.
- BRAZUNA JC, SILVA EA, BRAZUNA JM, DOMINGOS IH, CHAVES N, HONER MR, VAN ONSELEN VJ, OLIVEIRA AL. (2012). Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. *Rev Soc Bras Med Trop.* Oct;45(5):601-6.
- CARCELÉN, J., INIESTA V., FERNÁNDEZ-COTRINA J., SERRANO F., PAREJO, J.C., CORRALIZA I., GALLARDO-SOLER A., MARAÑÓN F., SOTO M., ALONSO C., GÓMEZ-NIETO C. (2009). The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence

of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* 27, 5964–5973.

CARRILO *ET AL.*, 2008. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11, PFR-2 leishmanial antigens in experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902-1911.

CHARLAB, R., VALENZUELA, J.G., ROWTON, E.D., RIBEIRO, J.M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*;96:15155–60.

COLLIN, N., GOMES, R., TEIXEIRA, C., CHENG, L., LAUGHINGHOUSE, A., et al. (2009) Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog* 5(5): e1000441.

COOLER R.N, & REED S.G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*;21:244—9.

CORTADA VM, DOVAL ME, SOUZA LIMA MA, OSHIRO ET, MENESES CR, ABREU-SILVA AL, CUPOLILO E, SOUZA CS, CARDOSO FO, ZAVERUCHA DO VALLE T, BRAZIL RP, CALABRESE KS, GONÇALVES DA COSTA SC. (2004). Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Vet Res Commun. Jul*;28(5):365-74.

COSTA CH. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Mar-Apr;44(2):232-42. Epub 2011 Apr 1. Review.

COSTA DN, CODEÇO CT, SILVA MA, WERNECK GL. (2013). Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Aug 8;7(8):e2355.

COURA-VITAL W, MARQUES MJ, VELOSO VM, ROATT BM, AGUIAR-SOARES RD, REIS LE, BRAGA SL, MORAIS MH, REIS AB, CARNEIRO M. (2011). Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis.* Aug;5(8):e1291.

COURA-VITAL W, MARQUES M.J, GIUNCHETTI R.C, TEIXEIRA-CARVALHO A, MOREIRA N.D, VITORIANO-SOUZA J, VIEIRA P.M, CARNEIRO C.M, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO O.A, CARNEIRO M, REIS A.B. (2011). Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *Vet J. Nov*;190(2):e43-7.

COURA-VITAL W, REIS AB, REIS LE, BRAGA SL, ROATT BM, AGUIAR-SOARES RD, MARQUES MJ, VELOSO VM, CARNEIRO M. (2013). Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Vet Parasitol.* Jul 30. 4017(13)

COURA-VITAL, W., KER, H.G., ROATT, B.M., AGUIAR-SOARES, R.D., LEAL, G.G., MOREIRA, N.D., OLIVEIRA, L.A., DE MENEZES, E.M., MORAIS, M.H., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, M., REIS, A.B. (2014). Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One.* 2014 Mar 7;9(3):e91009.

COURTENAY, O., QUINNELL, R.J., GARCEZ, L.M., SHAW, J.J. AND DYE, C., (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186, 1314-1320.

CRUZ, A., COBURN, C.M., BEVERLEY, S.M., (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*;88:7170—4.

- CUNHA S, FREIRE M, EULALIO C, CRITOSVAO J, NETTO E, JOHNSON WD JR, REED SG, BADARO R. (1995). Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Mar-Apr;89(2):155-8.
- DA COSTA-VAL, A.P., CAVALCANTI, R.R., DE FIGUEIREDO GONTIJO, N., MICHALICK, M.S., ALEXANDER, B., WILLIAMS, P., MELO, M.N., (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J* 174, 636-643.
- DA SILVA, V.O., BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA PONTES, N.N., PARAGUAI DE SOUZA, E., LUZ, K.G., PALATNIK, M., et al. (2001). A Phase III trial of Efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*;19:1068—81.
- DA SILVA RA, TAVARES NM, COSTA D, PITOMBO M, BARBOSA L, FUKUTANI K, MIRANDA JC, DE OLIVEIRA CI, VALENZUELA JG, BARRAL A, SOTO M, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN C. (2011). DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *ActaTrop.* 2011 Dec;120(3):185-90.
- DANTAS-TORRES F. (2005). Increasing case-fatality rate of visceral leishmaniasis in Brazil. *REVISA*, 1:260-263.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P., (2006). Visceral Leishmaniasis In Brazil: Revisiting Paradigms Of Epidemiology And Control. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48(3):151-156, May-June
- DARRAH, P.A, PATEL, D.T, DE LUCA, P.M, et al. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine*, v. 13, n. 7, p. 843–50, 2007.
- DAVOUDI, N., TATE, C.A., WARBURTON, C., MURRAY, A., MAHBOUDI, F.M.C., MASTER, W.R. (2005). Development of a recombinant *Leishmania major* strain sensitive to ganciclovir and 5-fluoro cytosine for use a live challenge in clinical trials. *Vaccine*;23:1170—7.
- DAY, M.J. (2007) Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet. Parasitol.* 147, 2–8.
- de Amorim I.F, Freitas E, Alves C.F, Tafuri W.L, Melo M.N, Michalick M.S, da Costa-Val A.P. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010 Oct 11;173(1-2):55-63.
- DEANE, L. M. (1956). Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará (Tese de Doutorado em Parasitologia). Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 162 p.
- DEANE, L. M. (1961). Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 7, 161-169.
- DEANE, L. M., & DEANE, M. P. (1962). Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v.4, p.198-212.
- DESJEUX, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- DIETZE, R., BARROS, G. B., TEIXEIRA, L., HARRIS, J., MICHELSON, K., FALQUETO, A., & COREY, R. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 25, 1240-1242.

- D'OLIVEIRA JÚNIOR A, COSTA SR, BARBOSA AB, ORGE M DE LA G, CARVALHO EM. (1997). Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jan-Feb;92(1):15-20.
- DOS SANTOS FR, VIEIRA PM, CORREA-OLIVEIRA R, GIUNCHETTI RC, CARNEIRO CM, REIS AB, MALAQUIAS LC. (2011). Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Parasitol Res*. Jun;108(6):1397-403.
- DUMONTEIL, E., MARIA JESUS, R. S., JAVIER, E. O. AND MARIA DEL ROSARIO, G. M. (2003). DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 21, 2161–2168.
- DYE, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125-130.
- FERNANDES, A. P., COSTA, M. M., COELHO, E. A., MICHALICK, M. S., DE FREITAS, E., MELO, M. N., LUIZ TAFURI, W., RESENDE, D. DE M., HERMONT, V., ABRANTES, C. DE F., GAZZINELLI, R. T. (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*. 26, 5888-95.
- FIUZA, J. A., SANTIAGO, H.C., SELVAPANDIYAN, A., GANNAVARAM, S., RICCI N.D., ET AL. (2013). Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. *Vaccine* (IN PRESS).
- FRAGA, D.B., SOLCA, M.S., SILVA, V.M., BORJA, L.S., NASCIMENTO, E.G., OLIVEIRA, G.G., PONTES-DE-CARVALHO, L.C., VERAS, P.S. AND DOS-SANTOS, W.L., (2012). Temporal distribution of positive results of tests for detecting *leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. *Vet Parasitol*.
- FRANCA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., SIQUEIRA, A.M., MACHADO-COELHO, G.L., DA COSTA, C.A., MAYRINK, W., VIEIRA, E.P., COSTA, J.S., GENARO, O., NASCIMENTO, E.(2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. v. 111, n. 2-3, p. 161-73, Feb 13 2003.
- FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A., ROURA, X., (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 137, 214-221.
- FREIDAG, B.L. ET AL. (2003) Immunological and pathological evaluation of rhesus macaques infected with *Leishmania major*. *Exp. Parasitol*. 103, 160–168.
- FUJIWARA, R. T., VALE, A. M., FRANCA DA SILVA, J. C., DA COSTA, R. T., QUETZ, J. S., MARTINS FILHO, O. A., REIS, A. B., CORREA, O. R., HADO-COELHO, G. L., BUENO, L. L., BETHONY, J. M., FRANK, G., NASCIMENTO, E., GENARO, O., MAYRINK, W., REED, S., & CAMPOS-NETO, A. (2005). Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 36, 827-838.
- GARCIA-NAVARRO CEK 2005, Hemograma, In: Garcia-Navarro, C.E.K. (Ed.) Manual de hematologia veterinária. Varela, São Paulo, pp. 79-99.
- GARG, R., & DUBE, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, 123: 439 – 454.
- GENARO, O., PINTO, J. A., DA COSTA, C. A., FRANCA-SILVA, J. C., COSTA, R. T., SILVA, J. C., & MAYRINK, W. (1996). Phase III randomized double blind clinical trial of the

efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91, 166.

GIUNCHETTI, R.C. (2004). Influência do parasitismo sobre os aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral canina (Dissertação de Mestrado em Imunoparasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 101p.

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. (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J. Comp Pathol., 135, 100-107.

GIUNCHETTI, R.C. (2007). Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra Leishmaniose Visceral Canina (Dissertação de Doutorado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 233p.

GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. O., VITORIANO-SOUZA, J., MOREIRA, N. D., MALAQUIAS, L. C., CASTRO, L. L. M., LANA, M., REIS, A. B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine 25, 7674-7686.

GIUNCHETTI, R. C., MARTINS-FILHO, O. A., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., MARQUES, M. J., TAFURI, W. L., CORREA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B. (2008a). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol., 121, 23-33.

GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., CARNEIRO, C. M., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O. A., MARQUES, M. J., TAFURI, W. L., & REIS, A. B. (2008b). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res. Vet. Sci., 84, 269-277.

GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. O., COURA-VITAL, W., ABREU, R. T., MALAQUIAS, L. C., GONTIJO, N. F., BROSKYN, C., OLIVEIRA, C. I., COSTA, D. J., LANA, M., & REIS, A. B. (2008c). A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. Vaccine 26, 623-638.

GIUNCHETTI, R.C., REIS, A.B., DA SILVEIRA-LEMONS, D., MARTINS-FILHO, O.A., CORREA-OLIVEIRA, R., BETHONY, J., VALE, A.M., DA SILVA QUETZ, J., BUENO, L.L., FRANCA-SILVA, J.C., NASCIMENTO, E., MAYRINK, W., FUJIWARA, R.T. (2008d). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. Res. Vet. Sci., 85, 106–112.

GONZALO, R.M., DEL REAL, G., RODRIGUEZ, J.R., RODRIGUEZ, D., HELJASVAARA, R., LUCAS. P, et al. (2002). A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. Vaccine Jan 15;20(7–8):1226–31.

GOULD IT, PERNER MS, SANTINI MS, SAAVEDRA SB, BEZZI G, MAGLIANESE MI, ANTMAN JG, GUTIÉRREZ JA, SALOMÓN OD.(2013). Visceral leishmaniasis in Argentina. Cases notification and distribution of vectors (2006-2012). Medicina (B Aires). 2013;73(2):104-10. Spanish.

GRADONI, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. Vet. Parasitol. 100, 87-103.

- GRADONI, L., FOGLIA MANZILLO, V., PAGANO, A., PIANTEDOSI, D., DE LUNA, R., GRAMICCIA, M., et al. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected. *Vaccine*;23:5245—51.
- GRIMALDI, JR .G., & TESH, R.B. (1993). Leishmanioses of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.6, p.230-250.
- GURUNATHAN, S., SACKS, D. L., BROWN, D. R., REINER, S. L., CHAREST, H., GLAICHENHAUS, N. AND SEDER, R. A. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine* 186, 1137–1147.
- GURUNATHAN, S., PRUSSIN, C., SACKS, D. L. AND SEDER, R. A. (1998). Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine* 4, 1409–1415.
- GURUNATHAN, S., STOBIE, L., PRUSSIN, C., SACKS, D. L., GLAICHENHAUS, N., IWASAKI, A., FOWELL, D. J., LOCKSLEY, R. M., CHANG, J. T., WU, C. Y. AND SEDER, R. A. (2000). Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8⁺ T cells. *Journal of Immunology* 165, 915–924.
- HAILU, A, VAN BAARLE, D, KNOL, G.J, et al. (2005). T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *L. donovani*. *Clinical Immunology*. 117, 182-191.
- HOLZMULLER, P. ET AL. (2005a) Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* coincubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 247–257.
- HOLZMULLER, P., SERENO, D., LEMESRE, J.L., (2005B), Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 4406-4409.
- HOMMEL, M., JAFFE, C. L., TRAVI, B., & MILON, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 Suppl 1, 55-73.
- INIESTA V, CORRALIZA I, CARCELÉN J, GÓMEZ G.L, FERNÁNDEZ-COTRINA J, PAREJO J.C, CARRIÓN J, SOTO M, ALONSO C, GÓMEZ NIETO C. (2008). *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitol Res.* Apr;102(5):887-93.
- JERONIMO, S. M., HIGGS, E., VEDVICK, T., MANN, B. J., JERNIGAN, J., PETRI, W. A., JR., & PEARSON, R. D. (1995). Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 172, 1055-1060.
- KAMHAWI, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect*;2:1765–73.
- KAYE, P., & SCOTT, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* Jul 11;9(8):604-15.
- KEDZIERSKI, L., ZHU, Y., & HANDMAN, E.(2006). *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, 133, S87–S112.
- KEMP, M, KURTZHALS, J.A, KHARAZMI, A, THEANDER, T.G. (1993). Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunol Cell Biol.* 71, 583-7.

- KENSIL C.R, PATEL U, LENNICK M, MARCIANI D.J. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol*;146:431–7.
- KENSIL, C. R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*13, 1-55.
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.
- LAINSON R, SHAW JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 1978;273(5664):595—600.
- LAGE, R. S., OLIVEIRA, G. C., BUSEK, S. U., GUERRA, L. L., GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., & REIS, A. B. (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 135-145.
- LAGLER, H, WILLHEIM, M, TRAUNMÜLLER, F, et al. (2002). Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis: $\gamma\delta^+$ T cells express both type 1 cytokines and IL-10. *Scan. J. Immun.* 57, 291-295.
- LANGE, U. G., MASTROENI, P., BLACKWELL, J. M. AND STOBBER, C. B. (2004). DNA-*Salmonella enterica* serovar Typhimurium primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. *Infection and Immunity* 72, 4924–4928.
- LASRI, S. ET AL. (1999) Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet. Res.* 30, 441–449.
- LAURENTI MD, ROSSI CN, MATTA VL, TOMOKANE TY, CORBETT CE, SECUNDINO NF, PIMENTA PF, MARCONDES M. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.
- LEMESRE, J. L., HOLZMULLER, P., CAVALEYRA, M., GONCALVES, R. B., HOTTIN, G., & PAPIEROK, G. (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 23, 2825-2840.
- LEMESRE, J. L., HOLZMULLER, P., GONCALVES, R. B., BOURDOISEAU, G., HUGNET, C., CAVALEYRA, M., & PAPIEROK, G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine.* 25, 4223-4234.
- LERNER, E.A., RIBEIRO, J.M., NELSON, R.J., LERNER, M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*, 266:11234–6.
- Lira, R. A., Cavalcanti, M. P., Nakazawa, M., Ferreira, A. G. P., Silva, E. D., Abath, F. G. C., Alves, L. C., Souza, W. V., Gomes, Y. M., 2006. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 137, 11–16.
- MAUEL, J. (2002). Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 2, 201-226.
- MALAQUIAS LC, DO CARMO ROMUALDO R, DO ANJOS JB JR, GIUNCHETTI RC, CORRÊA-OLIVEIRA R, REIS AB. (2007). Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniasis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol Res. Jan*;100(2):233-9. Epub 2006 Aug 29.

- Marcondes M, Ikeda F.A, Vieira R.F, Day M.J, Lima V.M, Rossi C.N, Perri S.H, Biondo A.W. (2011). Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against *Leishmania* with Leishmune®. *Vet Parasitol.* Sep 27;181(2-4):153-9.
- Marcondes M, de Lima V.M, de Araújo M.de. F, Hiramoto R.M, Tolezano J.E, Vieira R.F, Biondo A.W. (2013). Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol.* 2013 Nov 8;197(3-4):649-52.
- MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E. A., GOMES, D. C., VILELA, M. C., MASIOLI, C. Z., TAVARES, C. A., FERNANDES, A. P., AFONSO, L. C. AND REZENDE, S. A. (2005). Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research* 98, 67–74.
- MAYRINK, W. ET AL. (1996) Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 695–697.
- MAYRINK, W., GENARO, O., SILVA, J. C., DA COSTA, R. T., TAFURI, W. L., TOLEDO, V. P., DA SILVA, A. R., REIS, A. B., WILLIAMS, P., & DA COSTA, P. W. (1996). Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 695-697.
- MCSHANE, H. (2002). Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 4, 23–27.
- MELBY, P.C., YANG, J., ZHAO, W., PEREZ, L.E., CHENG, J. (2001). *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*; 69(8): 4719–25.
- MENEZES-SOUZA D, CORRÊA-OLIVEIRA R, GUERRA-SÁ R, GIUNCHETTI RC, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, OLIVEIRA GC, REIS AB.(2011). 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.* 2011 Apr 19;177(1-2):39-49.
- MENEZES-SOUZA D, GUERRA-SÁ R, CARNEIRO CM, VITORIANO-SOUZA J, GIUNCHETTI RC, TEIXEIRA-CARVALHO A, SILVEIRA-LEMOS D, OLIVEIRA GC, CORRÊA-OLIVEIRA R, REIS AB. (2012). Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1566.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005). Nota Técnica Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishimune® 29/07/2005, Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf. Acesso em 10/02/2010.
- MINISTERIO DA SAÚDE (2007), Instrução Normativa Interministerial, número 31[IN-31] 09/07/2007, Brasília, Brasil.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009), Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de vigilância em saúde, Brasília, Brasil. 120p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009b). Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas anti-leishmaniose visceral canina registradas no MAPA (03/05/2009), Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_esclarecimento.pdf. Acesso em 10/02/2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010). Boletim Eletrônico Epidemiológico, nº2, Abril 2010. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Núcleo de Comunicação Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 24p.

- MICHALSKY, E.M., ROCHA, M.F., DA ROCHA LIMA, A.C., FRANCA-SILVA, J.C., PIRES, M.Q., OLIVEIRA, F.S., PACHECO, R.S., DOS SANTOS, S.L., BARATA, R.A., ROMANHA, A.J., FORTES-DIAS, C.L. AND DIAS, E.S. (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 147, 67-76.
- MOHEBALI, M. ET AL. (2004) Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I. R. Iran. *Vaccine* 22, 4097–4100.
- MOLANO, I. ET AL. (2003) A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 1–13.
- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 491-493.
- MOREIRA, N. D., GIUNCHETTI, R. C., CARNEIRO, C. M., VITORIANO-SOUZA, J., ROATT, B. M., MALAQUIAS, L. C., CORREA-OLIVEIRA, R. & REIS, A. B. (2009). Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunization with two different vaccines against visceral leishmaniasis. *Vet. immunol. Immunopathol.* 128, 418-424.
- MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C., GONZALEZ, F., BLANCO, F., BARKER, D. C., & ALVA, J. (1999). The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71, 181-195.
- MORENO, J. ET AL. (2007) Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290–5300.
- MUYOMBWE, A., OLIVIER, M., HARVIE, P., BERGERON, M.G., OUELLETTE, M., PAPADOPOULOU, B. (1998). Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis*;177:188—95.
- NOGUEIRA, F.S. ET AL. (2005) Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23, 4805–4810.
- NEOGY, A. B., VOULDOUKIS, I., DA COSTA, J. M., MONJOUR, L. (1994). Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Group of Lupino. Vet. Parasitol.*, 54, 367-373.
- NIETO, J., ALVAR, J., MULLEN, A. B., CARTER, K. C., RODRIGUEZ, C., SAN ANDRES, M. I., SAN, A., BAILLIE, A. J., & GONZALEZ, F. (2003). Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate formulations after intravenous administration in animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2781-2787.
- NOAZIN S, MODABBER F, KHAMESIPOUR A, SMITH P.G, MOULTON LH, NASSERIK, et al. (2008). First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*;26(52):6759–67.
- NOLI, C. & AUXILIA, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213-232.
- NYLÉN, S. ET AL. (2006) Surrogate markers of immunity to *Leishmania major* in leishmanin skin test negative individuals from an endemic area re-visited. *Vaccine* 24, 6944–6954.
- O'HAGAN, D. T., & VALIANTE, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 727-735.

- OLIVEIRA F, KAMHAWI S, SEITZ AE et al. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 2006;24:374–90.
- OLIVEIRA-FREITAS E, CASAS C.P, BORJA-CABRERA G.P, SANTOS F.N, NICO D, SOUZALOP, et al. (2006). Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*;24:3909–20.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., DUTRA, H.S., BOROJEVIC, R. (1993) *Leishmania donovani* surface glycoproteins GP36, is the major immunogen component of the Fucose Mannose Ligand (FML). *Acta Tropica*;53:59—72.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., BUNN-MORENO, M.M., PARAGUAI-DE-SOUSA, E., BOROJEVIC, R. (1994). The FML vaccine (fucose-mannose ligand) protects hamsters from experimental kala-azar. *Ciência e Cultura (J Braz Assoc Adv Sci)*;46:290—6.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., GOMES, E.M., PARAGUAI-DE-SOUSA, E., LUZ, K., PALATNIK, M., BOROJEVIC, R. (1995). *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;89:390—3.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., DOS SANTOS, W. R., FRANCA-SILVA, J. C., DA COSTA, R. T., REIS, A. B., PALATNIK, M., MAYRINK, W., & GENARO, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 510-517.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. (2008) Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709–1724.
- PANARO MA, LISI S, MITOLO V, ACQUAFREDDA A, FASANELLA A, CARELLI MG, BRANDONISIO O. (1998). Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios.* 95(380):151-60.
- PAPADOPOULOU, B., ROY, G., BRETON, M., KUNDING, C., DUMAS, C., FILLION, I., et al. (2002). Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* biopterin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun*;70:62—8.
- PARRA, L.E., BORJA-CABRERA, G.P., SANTOS, F.N., SOUZA, L.O.P., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., MENZ, I. (2007). Safety trial using the LeishmuneR vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*;25:2180—6.
- PASA, S., TOZ, S. O., VOYVODA, H., OZBEL, Y. (2005). Clinical and serological followup in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.* 128, 243-249.
- PINELLI E, GEBHARD D, MOMMAAS AM, VAN HOEIJ M, LANGERMANS JA, RUITENBERG EJ, RUTTEN VP.(2000). Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol.* 2000 Oct 1;92(3):181-9.
- POOT, J. ET AL. (2006) Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24, 2460–2468.
- POOT J., JANSSEN, L.H.M., KASTEREN-WESTERNENG, T.J., VAN, HEIJDEN-LIEFKENS, K.H.A., VAN DER, SCHIJNS, V.E.J.C., HECKEROTH, A. (2009). Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine* 27,4439-4446.

- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE (2007). Site: <http://www.pbh.gov.br/smsa/biblioteca/protocolos/leishmanioseteguvis.pdf> Acesso em 20/01/2009.
- PROFETA DA LUZ, Z. M., PIMENTA, D. N., CABRAL, A. L., FIUZA, V. O., & RABELLO, A. (2001). Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34, 249254.
- QUINNELL RJ, COURTENAY O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* Dec;136(14):1915-34.
- QUINNELL, R.J, COURTENAY, O, SHAW, M.A, et al. (2001) Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421-1424, 2001.
- RAFATI, S. ET AL. (2005) 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* 23, 3716–3725.
- RAMIRO, M.J. ET AL. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474–2484.
- RAMOS, I. ET AL. (2008) Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant.
- RAVINDRAN, R. & ALI, N. (2004). Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr. Mol. Med.* 4, 697-709.
- REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., FRANCA-SILVA, J. C., GIUNCHETTI, R. C., GENARO, O., & CORREA-OLIVEIRA, R. (2006A). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68-75.
- REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., GUERRA, L. L., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., GENARO, O., CORREA-OLIVEIRA, R., & MARTINS-FILHO, O. A. (2006b). 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.* 146, 303-311.
- REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., GUERRA, L. L., ANDRADE, R. A., CORREA-OLIVEIRA, R., & MARTINS-FILHO, O. A. (2006c). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102-116.
- REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., TAFURI, W. L., & CORREA-OLIVEIRA, R. (2009). Systemic and compartmentalized immune responses in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87-95.
- REIS, A. B., GIUNCHETTI, R. C., CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O. A., MORENO, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Trends Parasitology, Review.*
- REIS, A.B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C., ROATT, B.M., COURAVITAL, W., NICOLATO, R.C., SILVEIRA-LEMOS, D., CORRÊA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O.A. Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014 Feb 15;157(3-4):190-6.
- REIS A.B, TEIXEIRA-CARVALHO A, GIUNCHETTI R.C, ROATT B.M, COURAVITAL W, NICOLATO R.D.E C, SILVEIRA-LEMOS D, CORRÊA-OLIVEIRA R,

- MARTINS-FILHO O.DE. A. (2014). Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral leishmaniasis Vet Immunol Immunopathol. Feb 15;157(3-4):190-6.
- Resende L.A, Roatt B.M, Aguiar-Soares R.D, Viana K.F, Mendonça L.Z, Lanna M.F, Silveira-Lemos D, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho O.A, Fujiwara R.T, Carneiro C.M, Reis A.B, Giunchetti R.C. (2013). Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. Vet Parasitol. Dec 6;198(3-4):371-81.
- RESTIFO, N. P., YING, H., HWANG, L. AND LEITNER, W. W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. Gene Therapy 7, 89–92.
- RHALEM, A., SAHIBI, H., LASRI, S., JAFFE, C. L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. Vet. Immunol. Immunopathol., 71, 69-76.
- RIBAS LM, ZAHER VL, SHIMOZAKO HJ, MASSAD E. (2013). Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. ScientificWorldJournal. Aug 5;2013:810380.
- RIBEIRO, J.M., KATZ, O., PANNELL, L.K., WAITUMBI, J., WARBURG, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5' α -AMP. J Exp Biol;202:1551–9.
- ROATT,B.M., AGUIAR-SOARES, R.D.O., VITORIANO-SOUZA, J., COURA-VITAL, W., ET AL. (2012).Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. PLOS ONE.,v. 7 (11):e49780
- RODRÍGUEZ-CORTE'S, A. ET AL. (2007) Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. Vaccine 25, 7962–7971.
- RODRIGUES CA, BATISTA LF, TEIXEIRA MC, PEREIRA AM, SANTOS PO, DE SÁ OLIVEIRA GG, DE FREITAS LA, VERAS PS. (2007). Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. Vet Parasitol. Feb 28;143(3-4):197-205.
- ROMERO M, LÓPEZ M, ECHEVERRY M, RIVAS F. (2008). Canine Visceral Leishmaniasis: diagnostic tests do not detect real state of the infection. Rev Salud Publica (Bogota). Mar-May;10(2):290-8. Spanish.
- SACKS, D, & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *L. major* mice. Net. Rev. Immunol. 2, 845-858, 2002.
- SALDARRIAGA, O.A. ET AL. (2006) Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. Vaccine 24, 1928–1940.
- SANTOS, W.R., DE LIMA, V.M.F, PARAGUAI-DE-SOUZA, E., BERNARDO, R.R., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. (2002). Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. Vaccine;21:30—43.
- SANTOS, W.R., AGUIAR, I.A., PARAGUAI-DE-SOUZA, E., DE LIMA, V.F.M., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. (2003). Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FMLvaccine. Vaccine;21(32):4668—76.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N., MYLONAKIS, M. E., LEONTIDES, L. S., BILLINIS, C., KOUTINAS, A. F., GALATOS, A. D., GOULETSOU, P., DIAKOU, A., KONTOS, V. I.

- (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet. Parasitol.*, 130, 199-205.
- SEDER, R.A, DARRAH, P.A, ROEDERER, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 8 (6), 486, 2008.
- SINAN, 2012. Doenças de notificação compulsória – SINAN(Sistema de Notificação de Agravos de Notificação). Ministério da Saúde, 2013. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_dnc.htm.
- SISTO M, BRANDONISIO O, PANARO MA, ACQUAFREDDA A, LEOGRANDE D, FASANELLA A, TROTTA T, FUMAROLA L, MITOLO V. (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Oct;24(4):247-54.
- SOTO, M., REQUENA, J.M., QUIJADA, L., ALONSO, C. (1998). Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*;36:58–63.
- SOUZA, A.E., BARRES, P.A., COOMBS, G.H., MOTTRAM, J.C. (1994). Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*;63:213—20.
- SOUZA VA, CORTEZ LR, DIAS RA, AMAKU M, FERREIRA NETO JS, KURODA RB, FERREIRA F. (2012). Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica.* Oct;28(10):1949-64.
- STAUBER, L.A. (1955). Leishmaniasis in the hamster. In: Cole, W.H. (Ed.), *Some Physiological Aspects and Consequence of Parasitism*. Rutgers University Press, New York.
- STRAUSS-AYALI, D. ET AL. (2007) Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 38, 547–564.
- TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M., GONCALVES, R., DE MELO, M. N., MICHALICK, M. S., & TAFURI, W. L. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods* 292, 17-23.
- TAPIA, E., PEREZ-JIMENEZ, E., LOPEZ-FUERTES, L., GONZALO, R., GHERARDI, M. M. AND ESTEBAN, M. (2003). The combination of DNA vectors expressing IL- 12⁺ IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes and Infection* 5, 73–84.
- TAVARES, N. M., SILVA, R. A., COSTA, D. J., PITOMBO, M. A., ET AL. *Lutzomyia longipalpis* Saliva or Salivary Protein LJM19 Protects against *Leishmania braziliensis* and the Saliva of Its Vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5): e1169.
- TESH, R.B. (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.52, p. 287-292
- VITORIANO-SOUZA J., REIS, A. B., MOREIRA, N. D., GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, C. M. (2008). Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine.* 26, 3922-3931.
- VITORIANO-SOUZA J, MOREIRA N.D, TEIXEIRA-CARVALHO A, CARNEIRO C.M, SIQUEIRA F.A, VIEIRA P.M, GIUNCHETTI R.C, MOURA S.A, FUJIWARA R.T, MELO M.N, REIS A.B. (2012). Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One*;7(7):e40745

VOLLER, A. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). Ric. Clin. Lab 8, 289-298.

VOULDOUKIS, I., ROUGIER, S., DUGAS, B., PINO, P., MAZIER, D., & WOHRLE, F. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Vet. Parasitol., 135, 137-146.

WAINE, G. J. & MCMANUS, D. P. (1995). Nucleic acids: vaccines of the future. Parasitology Today 11, 113–116.

WHITE, A.C.J.R., CASTES, L., GARCIA, D., et al.(1992). *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 123-31.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Control of the leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*. v. 739, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2005). Leishmaniasis Seventeenth Programme Report Progress 2003-2004. Consultado em 12/2009 [online]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis.pdf>. Genebra.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Consultado em 06/2010 [online]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.

ZAVALA, F., RODRIGUES, M., RODRIGUEZ, D., RODRIGUEZ, J. R., NUSSENZWEIG, R. S. AND ESTEBAN, M. (2001). A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8⁺(T)cells. Virology 280, 155–159.

ZERPA O, ULRICH M, BORGES R, RODRÍGUEZ V, CENTENO M, NEGRÓN E, BELIZARIO D, CONVIT J. (2003). Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. Rev Panam Salud Publica. Apr;13(4):239-45.

11.1 – Ofício de aprovação do estudo no Comitê de Ética de Uso Animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 041/2011, de 26 de abril de 2011.

Ilma. Sr.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

CEDUFOP/UFOP

Senhor Pesquisador,

É com prazer que enviamos o certificado de aprovação do protocolo relativo ao uso de animais do seu projeto intitulado "Avaliação da toxicidade, imunogenicidade e eficácia das vacinas Leishmune, Leish-Tec, KMP-11 e LBSap em uma plataforma de bioprospecção para validar uma potencial vacina contra leishmaniose visceral canina em ensaio clínico vacinal de Fase I e II". Informamos também que para atender a resolução normativa nº. 1, artigo 6º, do CONCEA, ao final da execução do mesmo deverá ser encaminhado relatório à CEUA/UFOP, conforme modelo em anexo.

Atenciosamente,

p/wanderson geraldos de Lima
/Prof.ª. Dra. Maria Lúcia Pedrosa

Coordenadora da CEUA/UFOP.

11.2 – Tabela contendo os valores absolutos e desvio padrão da imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico, das diferentes populações celulares avaliadas no ensaio *ex vivo*

Grupos	Tempos	CD3⁺	CD3⁺ CD4⁺	CD3⁺ CD8⁺	CD21⁺	CD5⁻ CD16⁺	CD14⁺
	<i>T0</i>						
Controle^(a)		1746±404	1276±201	451±197	703±114	57±21	621±243
LBSap^(b)		1630±295	1275±264	412±132	738±339	60±18	621±144
Leishmune^(c)		1867±451	1609±542	560±130	935±237	63±19	759±223
Leish-Tec^(d)		1982±385	1436±281	600±153	928±290	56±19	692±194
KMP-11^(e)		1830±410	1332±309	421±143	694±456	66±15	809±261
	<i>T1</i>						
Controle^(a)		1877±402	1238±313	706±138	451±106	107±67	537±182
LBSap^(b)		2139±281	1160±240	931±266	493±143	107±73	925±48
Leishmune^(c)		2415±284	1439±293	897±280	669±146	115±45	819±132
Leish-Tec^(d)		2399±609	1438±463	960±306	543±209	87±27	633±224
KMP-11^(e)		2025±242	1383±219	662±85	512±188	81±28	944±296
	<i>T2</i>						
Controle^(a)		2224±407	1505±392	804±202	779±175	81±40	588±222
LBSap^(b)		2637±488	1440±330	1138±247	764±268	100±31	724±196
Leishmune^(c)		2152±731	1398±303	754±439	784±250	128±64	650±88
Leish-Tec^(d)		2963±823	1822±748	1042±175	967±416	97±49	666±244
KMP-11^(e)		2311±357	1555±287	757±247	806±203	91±43	848±170