

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BRUNO MENDES ROATT

**AVALIAÇÃO DE UMA VACINA TERAPÊUTICA (LBMPL) NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL UTILIZANDO O
CÃO NATURALMENTE INFECTADO COM *LEISHMANIA*
INFANTUM COMO MODELO EXPERIMENTAL**

OURO PRETO, MG

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BRUNO MENDES ROATT

**AVALIAÇÃO DE UMA VACINA TERAPÊUTICA (LBMPL) NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL UTILIZANDO O
CÃO NATURALMENTE INFECTADO COM *LEISHMANIA*
INFANTUM COMO MODELO EXPERIMENTAL**

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

Orientador: Dr. Alexandre Barbosa Reis

Co-Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

OURO PRETO, MG
2013

R628a

Roatt, Bruno Mendes.

Avaliação de uma vacina terapêutica (LBMPL) no tratamento da leishmaniose visceral utilizando o cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum* como modelo experimental [manuscrito] / Bruno Mendes Roatt. - 2013.

170 f.: il. color.; grafs.; tabs.; pranchas e fluxograma.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

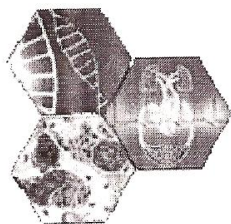
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Cão como animal de laboratório - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Teses. 3. Imunoterapia - Teses. 4. Vacinas - Teses. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161:615.371

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas




Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

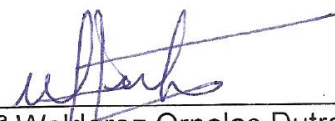
“LBMPL: Avaliação de uma vacina terapêutica no tratamento da leishmaniose visceral humana utilizando o cão naturalmente infectado por *leishmania infantum* como modelo experimental”

Aos vinte e seis dias do mês de Novembro de 2013, às 09:00h, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno **Bruno Mendes Roatt**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

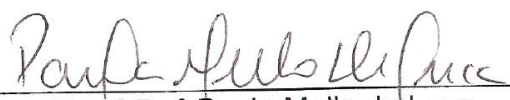
Membros da Banca Examinadora:



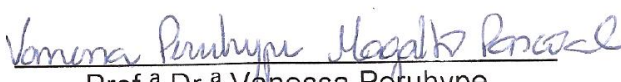
Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Examinadora (UFOP)



Prof.ª Dr.ª Walderez Ornelas Dutra
Examinadora



Prof.ª Dr.ª Paula Mello de Luca
Examinadora



Prof.ª Dr.ª Vanessa Peruhype
Magalhães Pascoal
Examinadora



Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
Presidente

DATA DA DEFESA: 26/11/2013

Colaboradores

Dra. Cláudia Martins Carneiro^I
Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira^{II}
Dr. Sydney Magno da Silva^{III}
Dr. Nelder Figueiredo Gontijo^{IV}
Dr. Jesus G. Valenzuela^V

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

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

III – Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, Minas Gerais.

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

V - Laboratory of Malaria and Vector Research, Vector Molecular Biology Section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA.

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – Projeto FAPEMIG/PPSUS-2010 e Demanda Universal FAPEMIG 01/2012

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa - Chamada Universal – MCTI/CNPq nº 14/2013

CNPq – Edital MCT/CNPq N ° 70/2009 - Programa de Expansão da Pós-Graduação em Áreas Estratégicas – PGAEST - Doutorado - Bolsa de Doutorado.

Apoio

Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG)

Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ/MG

Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG/MG

"Ainda não descobri o segredo de acertar sempre, mas já aprendi a fórmula certa de fracassar: querer agradar a todos ao mesmo tempo"
(John Fitzgerald Kennedy)

Dedico esta tese,

Aos meus amados pais Míriam e Salmeron pela minha formação pessoal, pelo exemplo de vida, honestidade e amor;

A Paula, minha esposa, por me mostrar o amor verdadeiro, com diálogo, paciência, dedicação e cumplicidade;

Ao meu irmão Alexandre, pelo apoio incondicional na busca dos meus objetivos;

Agradecimentos

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho, iluminando meu caminho e dando forças para sempre seguir em frente. Mesmo nos momentos de maior dificuldade, Ele abria o caminho, iluminava para que eu pudesse seguir.

À minha família, em especial aos meus pais (Míriam e Salmeron), por se abdicarem muitas vezes dos seus sonhos para realizarem os meus, por serem as pessoas que me ensinaram sempre o caminho correto a seguir com honestidade e perseverança e acima de tudo pela construção da minha formação pessoal. Mãe e Pai, amo vocês. Ao meu irmão Alexandre, que com seu companheirismo e apoio sempre me mostrou um lado diferente da vida, obrigado por me ensinar que com trabalho e dedicação podemos sempre conquistar nossos objetivos.

À Paula minha esposa, que posso dizer desse incrível ser humano. Obrigado pela sua presença, incentivo, compreensão e carinho sempre constantes. Obrigado por estar comigo na realização deste trabalho, sabendo entender meus momentos de ansiedade, nervosismo e preocupação dando sempre uma palavra de conforto e companheirismo, pela sua cumplicidade e por caminhar sempre ao meu lado. Dizem que não existe a tal metade da laranja, que nunca encontraremos nossa cara metade. Mentira!!! Encontrei a minha... Amo você!

Aos meus avós Selda e Alarico (*in memoriam*) e Jarmir e Izabel (*in memoriam*) por torcerem por mim, pelos exemplos de vida e pela imensa contribuição no meu processo de formação pessoal que permitiu com que eu superasse limites, sei que aqui ao meu lado e de onde estiverem estão felizes com esta conquista. Ao meu tio Maurício, companheiro de longas datas, meu padrinho de casamento e incentivador. Sempre presente seja nos momentos de tristezas e alegrias, apoiando-me na busca de meus ideais e de minhas conquistas. Aos meus tios e tias, primos e primas que sempre torceram por mim e que participaram me apoiando nas decisões do dia a dia, obrigado.

Ao meu orientador, amigo e "pai científico" professor Alexandre Barbosa Reis de quem tive a honra de ser orientado. Obrigado pela confiança depositada em mim para execução

desse projeto e por ser responsável, um dos principais responsáveis, por ele existir. Lembro muito bem daquele 15/09/2011, sem um cão no canil, sem uma perspectiva e de repente estava em Governador Valadares batendo de casa em casa junto com o pessoal do CCZ para coletar os animais. Obrigado por me ensinar a trabalhar e fazer ciência de modo profissional e ético sempre propondo novos desafios nessa difícil escolha que é a carreira científica. Aliado aos seus conhecimentos científicos você tem contribuído de sobremaneira na minha formação profissional e humana. Pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal, fica aqui o meu voto de profunda gratidão.

Ao meu co-orientador professor Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pelos ensinamentos em como se trabalhar com o modelo cão, pela disposição em compartilhar suas experiências profissionais que foram de grande valia para construção de um pensamento mais crítico em relação à visão científica. Muito obrigado.

À professora Cláudia pelo exemplo de profissionalismo e equilíbrio que trás ao laboratório, por mostrar que também na ciência é preciso ter maturidade e principalmente respeito. Pela ajuda diária aos alunos que trabalham no CCA e principalmente pela atenção dada ao modelo cão.

À Secretária de Saúde de Governador Valadares - MG e principalmente ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ/GV). Meu agradecimento especial ao Dr. José Batista e à Dra. Antonieta, que receberam e acolheram nossa proposta. Sem o auxílio deles, este trabalho não aconteceria. À Aimara e as Dra. Luana e Vanilla, veterinárias do CCZ que me ajudaram na seleção dos animais e na administração das medicações prévias. Ao Geraldo, motorista da "carrocinha", por me auxiliar na coleta dos animais e trazê-los de forma segura a Ouro Preto. Obrigado a todos!

Ao amigo e companheiro de tese Rodrigo Dian, pelos anos de convivência desde a iniciação científica, quando entramos no laboratório em 2003, no mestrado e agora no doutorado, pela enorme ajuda na realização deste trabalho. Valeu cara!!!

A todos os amigos do laboratório de Imunopatologia, pela convivência e colaboração nesse trabalho. Em especial aos hoje doutorandos Henrique, Levi, Jamille e Fernando e ao

mestrando Rory, por estarem sempre dispostos acordando cedo, nos finais de semana, feriados, etc, para ajudar nas coletas e processamento do material. Sem a incansável ajuda de vocês, tenho certeza que não teria condições de concluir este trabalho. Por isso digo, esta conquista hoje minha, também é de vocês.

À Nádia, pesquisadora e companheira de longa data, pela convivência saudável ao longo de 10 anos de trabalho, pelo respeito mútuo e carinho construídos, muito obrigado. Ao pesquisador Wendel, pelos ensinamentos e troca de informações. Pelo profissionalismo diário e pela ajuda nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Sydney, pela ajuda e ensinamento nas avaliações clínicas dos cães e na metodologia de ultrassom. Sem você "camarada", boa parte destes resultados não teria sido construída. Muito obrigado!

Ao professor Evandro, Carolzinha, Kátia, Sheler, Aninha, Luíza, Leoneide, Daniela, Lucilene e Mariana pela agradável convivência.

À Renata, no auxílio das reações de bioquímica e e preciosa ajuda nas análises hematológicas dos cães. À Maria Chaves pela amizade e preciosa ajuda na manutenção das atividades diárias do laboratório. À Tânia, pelos ensinamentos e ajuda na melhoria da qualidade do nosso ambiente de trabalho.

Aos ICs, Marcelo, Tharik, Narjara e Mariana, pela ajuda no fim dos experimentos.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP, Hugo, Érica e Líliam pela facilidade de acesso a cada um, pela ajuda em solucionar os problemas que sempre encontramos quando se trata do trabalho com animais em experimentação. Muito obrigado.

Ao Jorge (Jorginho) e Eduardo, também funcionários do CCA/UFOP, pela ajuda na manutenção dos animais, limpeza e cuidado diário do canil.

Ao secretariado do programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, pela presteza e precisão nos serviços do programa e pelo empenho em resolver nossas dúvidas e pendências.

À Fiocruz-MG, em especial à Clari Lopes, secretária do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/CPqRR, pelo carisma, espontaneidade e pela ajuda nos momentos de maior aperto em relação a reagentes. Só ela para salvar a gente!

Aos docentes e colegas do Curso de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos e convivência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À FAPEMIG e CNPq pelo financiamento do projeto.

Não posso deixar agradecer aos donos dos cães que me doaram gentilmente os animais para que eu pudesse realizar este estudo. Além disso, não tenho palavras para expressar minha gratidão aos cães, modelo experimental único e de suma importância para construção do conhecimento científico na Leishmaniose Visceral. Agradeço a Jully, Pintadinha, Japão, Boca preta, Carente, Meg, Vitória, Belinha, Miuque, Leão, Spike, Pitbull, Henrique, Preto peludo, Zafira e a Pretinha que contribuíram com suas vidas para que este trabalho fosse realizado.

A todos aqueles que por um momento de distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo de modo efetivo para a sua realização.

A todos,
meu sincero agradecimento.

R628a	Roatt, Bruno Mendes.....	3
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	- Aspectos gerais da Leishmaniose e Leishmaniose Visceral.....	6
2.2	- Cão como modelo experimental na LV: aspectos imunopatológicos	9
2.3	- Tratamento das Leishmanioses: Quimioterapia e Imunoterapia	14
3.	JUSTIFICATIVA	21
4.	OBJETIVOS	23
4.1	- Objetivo geral	24
4.2	- Objetivos específicos	24
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1	- Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante MPL.....	26
5.2	- Grupos Experimentais e manejo dos animais.....	27
5.3	- Critérios de inclusão e composição dos grupos experimentais	28
5.4	- Protocolos de imunoterapia	30
5.5	- Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma e provas bioquímicas	32
5.6	- Avaliações laboratoriais e imunológicas	33
5.6.1	- Avaliação do quadro hematológico e provas bioquímicas	33
5.6.2	- Avaliação da resposta imune celular no contexto <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	35
5.6.3	- Obtenção de amostras de sangue periférico para avaliações no contexto <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	35
5.6.4	- Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto <i>ex vivo</i>	36
5.6.5	- Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo no contexto <i>ex vivo</i>	37
5.6.6	- Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto <i>in vitro</i>	41
5.6.7	- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto <i>in vitro</i>	42
5.6.8	- Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	46
5.6.9	- Quantificação de TNF- α e IL-10 por ELISA.....	49
5.7	- Punções aspirativas de medula óssea	50
5.8	- Biópsia de pele.....	51
5.9	- Punções aspirativas de baço guiadas por ultrassom e avaliação de esplenomegalia	51
5.10	- Avaliação clínica e construção do score clínico dos animais	52
5.11	- Análise Molecular para quantificação da carga parasitária no baço, pele e medula óssea pela técnica de PCR em tempo real	53
5.11.1	- Extração de DNA de tecidos	53
5.11.2	- Clonagem dos produtos da amplificação do gene de <i>L. infantum</i>	54
5.11.3	- Reação em cadeia da Polimerase - PCR.....	54
5.11.4	- Clonagem	54
5.11.5	- Preparo de bactérias competentes, transformação bacteriana e purificação dos vetores por lise alcalina	55
5.11.5	- Construção da curva-padrão para a PCR em tempo real	56
5.12	- Xenodiagnóstico	59
5.13	- Necropsia e avaliação <i>post mortem</i>	60
5.14	- Análises estatísticas.....	60
6.	RESULTADOS	62

6.1 – Avaliação dos parâmetros laboratoriais.....	64
6.1.1 - Hemograma (Leucograma e Eritrograma).....	64
6.1.2 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	66
6.1.3 - Avaliação da resposta imune no contexto <i>ex vivo</i>	71
6.1.4 - Avaliação da resposta imune no contexto <i>in vitro</i>	74
6.2 – Avaliação clínica e da esplenomegalia por ultrassom.....	80
6.2.1 - Exame físico e <i>score</i> clínico.....	80
6.2.2 - Avaliação da esplenomegalia por ultrassom.....	87
6.3 – Avaliação parasitológica pela PCR em tempo real.....	91
6.3.1 - Avaliação da carga parasitária no baço, pele e medula óssea.....	91
7. DISCUSSÃO.....	95
8. CONCLUSÕES.....	116
9. PERSPECTIVAS.....	120
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
11. ANEXOS.....	140

ALT	Alaninaminotransferase
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AST	Aspartatoaminotransferase
ASLi	Antígeno Solúvel de <i>L. infantum</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
BSA	Albuma Sérica Bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCA	Centro de Ciência Animal
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Ct	Ciclo <i>Threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DPP [®]	<i>Dual Path Platform</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Tamanho)
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HTT	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
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
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Linfócitos B
LBMPL	Vacina composta por antígenos de <i>L. braziliensis</i> associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A
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
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
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 (Complexidade/Granulosidade)</i>
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
TNF- α ,	Fator de necrose tumoral- α
Tris	Tris (Hidroximetil aminometano)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	<i>World Health Organization (OMS)</i>
X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>
μ m	Micrômetro
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

- Figura 1:** Biomarcadores de resistência e susceptibilidade nas diferentes formas clínicas da LVC conforme Reis et al., 2010.....13
- Figura 2:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas... ..38
- Figura 3:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas.....39
- Figura 4:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de células NK CD5⁺CD16⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas..40
- Figura 5:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos CD14⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas.41
- Figura 6:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ na cultura de CMSP em cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas..45
- Figura 7:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-4⁺ na cultura de sangue total em cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas.....49
- Figura 8:** Mapa do vetor p-GEM®-T Vector. A sequência representada mostra o sítio de clonagem, região codificadora para o gene de resistência a ampicilina e β -galactosidase. .55
- Figura 9:** Exemplo da curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de *L. infantum*. Em X estão demonstrados os valores de *Log* da concentração de parasitos (10^7 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%).....59
- Figura 10:** Avaliação da função renal através da dosagem de uréia e creatinina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas67
- Figura 11:** Avaliação da função hepática através da dosagem de TGP, TGO, Gama-GT, fosfatase alcalina e bilirrubina total em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas69
- Figura 12:** Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteína total, albumina, globulina e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por *L. infantum*

submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....71

Figura 13: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....73

Figura 14: Perfil celular de células NK (CD5⁻CD16⁺) e monócitos (CD14⁺) circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....74

Figura 15: Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica (LT CD4⁺ e LT CD8⁺) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....76

Figura 16: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. 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 e culturas controle não estimuladas (CE/CC) além dos valores médios e desvio padrão das razões entre os índices de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺/IL-4⁺ e LT CD8⁺ IFN- γ ⁺/IL-4⁺.78

Figura 17: Produção de TNF- α e IL-10 em CMSP de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice das citocinas TNF- α e IL-10 (razão CE/CC).....80

Figura 18: Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....82

Figura 19: Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas.....83

Figura 20: Avaliação da esplenomegalia em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O grupo MPL (n=5) está representado pelas barras na escala de cinza; o grupo LBMPL (n=9) está representado pelas barras na escala de verde. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os percentuais de animais classificados de acordo com a ausência de esplenomegalia (normal), esplenomegalia leve, moderada e importante.....88

Figura 21: Avaliação da carga parasitária no baço, pele e na medula óssea em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas94

Tabela 1: Valores hematológicos de referência (Leucograma e Eritrograma) de 45 cães normais.	33
Tabela 2: Valores de referência dos parâmetros de bioquímica sérica de 45 cães normais.	34
Tabela 3: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.	37
Tabela 4: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular no contexto <i>in vitro</i> em CMSP cultivadas por 5 dias.	44
Tabela 5: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	47
Tabela 6: Resultados das avaliações sorológicas e parasitológicas dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> componentes dos grupos experimentais antes de iniciar a imunoterapia (T0).	64
Tabela 7: Leucograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle.	65
Tabela 8: Eritrograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle.	66
Tabela 9: Carga parasitária na medula óssea, baço e pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle. ...	92

Fluxograma 1: Desenho experimental utilizado na avaliação dos diferentes protocolos imunoterápicos: grupo controle MPL (C) e grupo vacina de *L. braziliensis* associado ao adjuvante monofosforil lipídeo A (LBMPL). T0 = tempo antes da imunoterapia; T15 = 15 dias após tratamento (75 dias de acompanhamento); T30 = 30 dias após tratamento (90 dias de acompanhamento); T90 = 90 dias após tratamento (150 dias de acompanhamento).32

Prancha 1: Cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL. (A), (C) e (E) representam fotos do animal C1 antes do tratamento (T0). Presença de lesão crostosa no focinho, pelagem opaca com dermatite seborréica e despigmentação na região do focinho. (B), (D) e (F) representam fotos do animal C1 90 dias após a imunoterapia (T90). Presença de lesão no focinho com área maior de despigmentação, pelagem opaca com extensas regiões de alopecia na parte posterior, anterior e emagrecimento acentuado.85

Prancha 2: Cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com a vacina LBMPL. (A), (C) e (E) representam fotos do animal V2 antes do tratamento (T0). Presença de lesão crostosa no focinho, conjuntivite mucopurulenta, lesão de ponta de orelha com perda de pêlo e região considerável de vasculite além de lesão de ponta de rabo com região necrosante e perda total da pelagem local. (B), (D) e (F) representam fotos do animal V2 90 dias após a imunoterapia (T90). Ausência de conjuntivite com regressão total de lesões do focinho, regressão de lesão de ponta de orelha e de ponta de rabo com reconstituição de pelagem local.86

Prancha 3: Imagem por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL. (A) Antes do tratamento (T0). Note volume do órgão normal (distância entre as bordas de 1,35 cm). (B) 90 dias após a imunoterapia (T90). Aumento do volume do órgão sugestivo de esplenomegalia moderada (distância entre as bordas de 1,60 cm).89

Prancha 4: Imagem por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com a vacina LBMPL. (A) Antes do tratamento (T0). Note aumento do volume do órgão sugestivo de esplenomegalia importante (distância entre as bordas de 2,93cm). (B) 90 dias após a imunoterapia (T90). Regressão do volume do órgão sugerindo ausência de esplenomegalia (distância entre as bordas de 2,08cm).90

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, que afeta principalmente os países mais pobres. Epidemias urbanas de LV são observadas em várias cidades do Brasil e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS. Estima-se que a infecção HIV/*L. infantum* aumenta o risco em 100 a 2.320 vezes de se desenvolver uma LV grave. Atualmente, diversos são os relatos do surgimento de cepas resistentes do parasito aos fármacos convencionais. Sendo assim, o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas/terapêuticas (imunofármacos) contra a doença se faz necessário e urgente. Neste contexto, muitos modelos animais experimentais já foram avaliados e o cão, se destaca como um dos melhores modelos experimentais para o estudo da LV humana (LVH) bem como seu emprego em ensaios pré-clínicos, pois apresenta características clínico-patológicas e uma história natural de doença extremamente semelhantes à LVH ativa e grave. Dessa forma, nosso estudo buscou avaliar a estratégia de tratamento empregando uma vacina terapêutica composta por antígenos totais de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (vacina LBMPL) para LVH empregando cães sintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum*. Assim, 16 cães infectados foram subdivididos em dois grupos experimentais: um grupo que recebeu como imunoterapia o adjuvante monofosforil lipídeo A apenas, sendo considerado grupo controle (MPL; n=6) e outro que recebeu como imunoterapia a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (LBMPL n=10). Os animais foram submetidos a um esquema imunoterapêutico composto por 3 séries de tratamento, cada série de 10 doses com concentrações crescentes do antígeno vacinal (60µg – 300µg de antígeno protéico + 5µg - 25µg de MPL (dias 1-5) e / 300µg Ag + 25µg MPL (dias 6-10) 1ª série / 300µg Ag + 25µg MPL 2ª e 3ª séries) sob a via subcutânea com intervalo de 10 dias de descanso entre cada série. Os cães foram avaliados antes de serem tratados (T0) e após 15 (T15), 30 (T30) e 90 (T90) dias do tratamento sob os aspectos hemato-bioquímicos, imunológicos, clínicos e parasitológicos. Nossos principais resultados revelaram que a imunoterapia com a vacina LBMPL foi capaz de restabelecer e normalizar as principais alterações hematológicas (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas) e bioquímicas (uréia, AST ou TGO, fosfatase alcalina, bilirrubina, e proteína total) decorrentes da LVC e presentes antes do tratamento. Além disso, cães imunotratados com a vacina LBMPL responderam na avaliação *ex vivo*, com aumento de linfócitos T CD3⁺ e suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺), redução de linfócitos B CD21⁺, redução na razão T CD4⁺/T CD8⁺, aumento da razão LT/LB, aumento de células NK CD5⁻CD16⁺ e aumento de monócitos CD14⁺ circulantes como principais biomarcadores celulares de sucesso terapêutico no sangue periférico. Já no contexto das avaliações *in vitro*, animais submetidos à vacinoterapia com LBMPL desenvolveram forte memória imunológica antígeno-específica, capaz de induzir elevada atividade linfoproliferativa frente ao estímulo com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) acompanhado por reconhecimento preferencial de células T CD4⁺ e T CD8⁺-ASLi específicas. Interessantemente, foi também observado aumento tanto de linfócitos T CD4⁺IFN-γ⁺ e T CD8⁺IFN-γ⁺ bem como redução de linfócitos T CD4⁺ IL-4⁺ e T CD8⁺ IL-4⁺ após estimulação com ASLi e aumento na produção/secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e redução na produção de citocinas imunomodulatórias como IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP); citocina esta, responsável pela imunopatogênese da LV grave. Estes achados caracterizam perfil de resistência a infecção por *Leishmania* e resposta positiva ao tratamento nos cães imunotratados com a vacina terapêutica LBMPL. De forma surpreendente, em relação aos sinais clínicos sugestivos de LVC, os animais imunotratados

com LBMPL apresentaram redução drástica na intensidade e na quantidade de sinais/sintomas clínicos da LV, aumento da massa corporal além de redução da esplenomegalia avaliada clinicamente e por ultrassom, fatores estes intimamente associados ao sucesso terapêutico na doença humana. Somado-se a isso, a vacina LBMPL promoveu ainda uma redução da carga parasitária, avaliada aqui pela PCR em Tempo Real (qPCR), na medula óssea, baço e pele nos cães infectados, sendo até mesmo possível observar em alguns animais ausência de parasitismo nestes órgãos. Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam e reafirmam a indicação do cão naturalmente infectado com *L. infantum*, como modelo experimental pré-clínico de altíssimo valor na leishmaniose visceral. Além disto, nossos resultados permitem também sugerir o uso da imunoterapia com a vacina terapêutica LBMPL como uma potencial proposta de tratamento na leishmaniose visceral canina e/ou humana.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, tratamento, imunoterapia, vacina LBMPL, *Leishmania infantum*, cão.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is one of the most neglected diseases in the world, affecting mostly the poorest countries. Urban epidemics of VL are observed in several cities in Brazil and the disease has been seen as an opportunistic infection in HIV patients. It is estimated that, HIV/*L. infantum* co-infection increases the risk by 100-2320 times to develop a severe VL. Currently, several studies have addressed the rise of resistant strains of the parasite to conventional drugs. Thus the development of new prophylactic/therapeutic (immunological agents) strategies against the disease is necessary and urgent. In this context, many animal models have been evaluated, and the dog stands as one of the best experimental models for the study of human VL (HVL) as well as in preclinical trials, since dogs present clinical and pathological characteristics and natural history of the disease extremely similar to the active and severe HVL. Thus, our study aimed to evaluate the treatment strategy employing a therapeutic vaccine composed by antigens of *L. braziliensis* associated with MPL adjuvant (LBMPL vaccine) for HVL using symptomatic dogs naturally infected by *L. infantum*. Thus, 16 infected dogs were divided into two experimental groups: a group that received immunotherapy only with monophosphoryl lipid A adjuvant, considered the control group (MPL, n=6) and another group that received immunotherapy using the vaccine composed by antigens of *L. braziliensis* associated with MPL as adjuvant (LBMPL, n=10). The animals were subjected to an immunotherapeutic scheme consisting of 3 treatment series, each series composed of 10 doses with increasing concentrations of the vaccine antigen (60µg - 300µg antigen protein + 5µg - 25µg of MPL (day 1-5) and 300µg of LB antigen + 25µg of MPL (day 6-10) 1st series / 300µg antigen protein + 25µg of MPL 2nd and 3rd series) by subcutaneous route and a 10-day interval between each series. The dogs were evaluated before treatment (T0) and 15 (T15), 30 (T30) and 90 (T90) days after treatment under the hematological, biochemical, immunological, clinical and parasitological aspects. Our major results showed that immunotherapy with LBMPL vaccine was able to restore and normalize main hematological (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and platelets) and biochemical (urea, AST or SGOT, alkaline phosphatase, bilirubin, and total protein) parameters resulting from CVL present before treatment. In addition, in *ex vivo* analysis, immunotreated dogs with LBMPL vaccine responded with increased CD3⁺ T lymphocytes and their subpopulations (T CD4⁺ and T CD8⁺), reduction of CD21⁺ B lymphocytes and in the T CD4⁺/T CD8⁺ ratio, increased TL/BL ratio, NK cells (CD5⁻CD16⁺) and CD14⁺ monocytes as the main cellular biomarkers of therapeutic success in peripheral blood. In the *in vitro* context, animals subjected to LBMPL vaccinotherapy developed a strong antigen-specific immunologic memory, able to induce a high lymphoproliferative activity against *L. infantum* soluble antigen (ASLi) followed by a preferential recognition of ASLi-specific T CD4⁺ and T CD8⁺. Interestingly, an increase in both T CD4⁺IFN-γ⁺ and T CD8⁺IFN-γ⁺ lymphocytes was also observed as well as reduction of T CD4⁺IL-4⁺ and T CD8⁺IL-4⁺ lymphocytes after ASLi stimulation and increased production/secretion of pro inflammatory cytokines such as TNF-α and reduced production of immunomodulatory cytokines such as IL-10 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC). This cytokine (IL-10) is responsible for the severe VL immunopathogenesis. These findings characterize a resistant profile to *Leishmania* infection and positive response in dogs immunotreated with LBMPL therapeutic vaccine. Interestingly, concerning clinical signs of CVL, animals submitted to LBMPL vaccinotherapy showed drastic reduction in the intensity and number of clinical signs/symptoms of VL, increased body mass as well as reduction of splenomegaly assessed clinically and by ultrasound, factors closely associated with success

in the treatment of human disease. In addition, the LBMPL vaccine also promoted a reduction in parasite burden, assessed by Real Time PCR (qPCR) in bone marrow, spleen and skin of infected dogs, being even possible to observe some animals with no parasitism in these organs. The results obtained in this study confirm and reaffirm the statement that naturally infected dogs with *L. infantum* are the most important experimental preclinical model in visceral leishmaniasis. Furthermore, our results also allow recommending the use of immunotherapy with the LBMPL therapeutic vaccine proposed as a potential treatment for visceral leishmaniasis in both the canine and human disease.

Keywords: Visceral leishmaniasis, treatment, immunotherapy, LBMPL vaccine, *Leishmania infantum*, dog.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares obrigatórios da família Tripanossomatidae, da ordem Kinetoplastidae, do gênero *Leishmania*. As espécies consideradas agentes etiológicos da leishmaniose visceral (LV) pertencem ao complexo Donovanii que incluem: *L. donovani* e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*). A infecção por *Leishmania* resulta em distintas situações clínicas e imunopatológicas sendo a LV considerada a forma mais grave da doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 500.000 casos da doença e 50.000 óbitos ocorram a cada ano nos 88 países onde a LV é endêmica (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Estes números representam aproximações, pois a notificação é compulsória em somente 32 dos países endêmicos e mesmo nestes acredita-se que considerável proporção de casos não seja notificada. Do ponto de vista das manifestações clínicas no homem, a sintomatologia apresenta-se variável, podendo ocorrer desde casos assintomáticos até o calazar clássico, propriamente dito, que se caracteriza principalmente por: emagrecimento progressivo, caquexia, febre intermitente, mal estar, anemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia generalizada, anasarca, hipergamaglobulinemia e progressiva imunossupressão celular (Badaró et al.,1986). De um modo geral, o calazar na Índia, causado por *L. donovani*, apresenta características epidemiológicas de uma antropozoonose, acometendo principalmente indivíduos adultos, que podem apresentar tanto a forma visceral como a leishmaniose dérmica pós-calazar. Na Europa e nas Américas, a doença tem características zoonóticas, em que se observa a forma visceral em crianças, tendo como agente etiológico a *L. infantum* (WHO, 2010).

No contexto da leishmaniose visceral, os cães (*Canis familiaris*) ocupam posição de destaque na cadeia epidemiológica de transmissão do parasito. Este fato ocorre, devido à proximidade destes animais com o homem no ambiente doméstico, principalmente em áreas rurais e urbanas. Além disso, os cães apresentam elevado parasitismo cutâneo observado até mesmo nos animais assintomáticos que são considerados, dessa maneira, os principais reservatórios domésticos do parasito (Abranches et al., 1991; Reis et al., 2009). A leishmaniose visceral canina (LVC), assim como a LV humana (LVH) apresenta-se como uma doença complexa, caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas e variados graus de gravidade. Esta complexidade faz com que, ainda hoje, mais de cem anos após sua descoberta, não haja completo consenso científico sobre o seu manejo clínico. Neste sentido, um dos grandes desafios atuais dos pesquisadores para enfrentar o crescente avanço da LV em todo mundo é a busca por estratégias imunoproliféricas

empregando-se imunobiológicos que possam induzir imunoproteção, e deste modo ser empregado em estratégias terapêuticas, ou até mesmo em associação com novas drogas e/ou combinações terapêuticas capazes de promover a cura parasitológica. Tais abordagens poderiam ser empregadas como alternativas aos tratamentos de primeira escolha, visto o crescente número de casos humanos resistentes aos antimoniais pentavalentes em todo o mundo. Entretanto, até o momento, poucas são as opções terapêuticas para o tratamento da LV, considerando a redução crescente da eficácia terapêutica e a necessidade de novas alternativas que apresentem necessariamente baixa toxicidade e custo. Estes aspectos são fundamentais para que novas opções de tratamento possam ser utilizadas por países pobres, onde a doença é mais prevalente.

Neste cenário, os investimentos realizados nos últimos anos em pesquisas pré-clínicas e clínicas para testes com novas drogas ainda se mostram insuficientes. Desta forma, torna-se evidente a necessidade da caracterização de modelos experimentais que reflitam a história natural da LV favorecendo o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos e clínicos, visando avaliar novos fármacos, imunofármacos, imunomoduladores com ação terapêutica contra o agente etiológico da LV.

Na busca por estratégias terapêuticas empregando novos imunoterápicos ou imunoquimioterápicos, vários modelos experimentais têm sido utilizados em estudos pré-clínicos e na identificação de um modelo mais adequado que atenda aos testes de drogas e/ou vacinas que possam efetivamente direcionar de forma eficiente os ensaios clínicos em humanos. Vários trabalhos têm demonstrado a importância da utilização do cão como modelo ideal na determinação de parâmetros patológicos, imunológicos e clínicos causados pela infecção por *L. infantum*. Dessa forma, **“o cão é considerado o melhor modelo experimental para LV humana, pois apresenta características clínico-patológicas extremamente semelhantes à doença humana ativa”** (Genaro, 1993; Moreno & Alvar, 2002; Alvar et al., 2004; Reis et al., 2006a; Reis et al., 2009; Nieto et al., 2011).

Mais recentemente o uso de cães naturalmente infectados com *L. infantum* reforçou o emprego deste modelo em estudos relacionados a imunopatologia da LV. Tais estudos propõem biomarcadores de resistência e susceptibilidade a infecção por *L. infantum* que passaram a ser fundamentais nas avaliações terapêuticas e imunoproliféricas que empregam esse modelo experimental (Reis et al., 2010).

Considerando ainda, que o cão é o principal hospedeiro e reservatório doméstico da *L. infantum* é fundamental o estudo e a avaliação de novas estratégias terapêuticas

(imunoterapia) que possibilitem a avaliação clínica, hemato-bioquímica, imunológica, bem como, da redução e/ou cura parasitológica desses animais, como prerrogativa para utilização destas estratégias em um futuro ensaio clínico humano. Sendo assim, este trabalho avaliou a imunoterapia utilizando o imunobiológico constituído por antígenos totais de *L. braziliensis* associado ao adjuvante monofosforil lipideo A (LBMPL) como proposta de tratamento da LV, utilizando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* como modelo experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Aspectos gerais da Leishmaniose e Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, causadas por espécies distintas do gênero *Leishmania spp.*, sendo transmitidas por hospedeiros invertebrados, capazes de infectar desde o homem até animais silvestres e domésticos, estando distribuídas por diversas partes do mundo (WHO, 1990; Desjeux, 2004). Este complexo de doenças apresenta amplo espectro de formas clínicas dependente de vários aspectos: espécie do parasito, fatores eco-epidemiológicos, imunidade, características genéticas e estado nutricional do hospedeiro (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Em relação a leishmaniose visceral (LV), o agente etiológico causador da doença no velho mundo (Índia e Leste da África) é a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*; na China, Ásia Central, Sudeste da Europa, Mediterrâneo é a *Leishmania (L.) infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) também caracterizada como causadora da LV na América Latina (Lainson & Shaw, 1978; Lukes *et al.*, 2007).

Estima-se que aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas no mundo, encontram-se em risco de contrair leishmaniose e 12 a 14 milhões estão infectadas. Neste contexto, sabe-se que 59.000 pessoas morrem anualmente de leishmaniose visceral (LV) dentre as quais 35.000 são homens e 24.000, mulheres. 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). 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 seja notificada (Collin *et al.*, 2006; Maia-Elkhoury *et al.*, 2007). A incidência de leishmaniose humana é de 1,6 milhões ao ano, sendo meio milhão da forma visceral e 1,1 milhão da forma cutânea. Apesar deste enorme número de casos, apenas 500 mil casos de LV são notificados a cada ano (Ashford *et al.*, 1992; WHO, 1995; WHO, 2010) sendo que Índia, Brasil e Sudão contribuem com mais de 90% dos casos de LV no mundo, e o Brasil é o principal responsável pelo número de registro de casos nas Américas atingindo cerca de 90% do total (Monteiro *et al.*, 1994). A doença é responsável pela perda de 2.357.000 “disability-adjusted life years” – DALY’s, marcador utilizado para avaliar o efeito de uma enfermidade na população e que leva em conta mortes prematuras, horas de trabalho perdidas, gastos com tratamentos, dentre outros. Este marcador coloca a LV como a 9ª

doença infecciosa mais importante do mundo (Alvar *et al.* 2006; WHO 2010) e em termos globais, como terceira mais importante doença transmitida por insetos vetores, depois da malária e filariose (Reithinger & Davies 2002).

Atualmente considerada a mais negligenciada de todas as doenças negligenciadas, a LV além de endêmica encontra-se em franca expansão em várias regiões urbanas, peri-urbanas e rurais do Brasil, América Latina, Europa e de outras áreas do mundo. Destaca-se o aparecimento da doença em países do Mercosul, considerados anteriormente como indenes para LV, cuja forma clínica de ocorrência principal era leishmaniose tegumentar americana (LTA). Neste contexto, temos o cenário epidemiológico atual da Argentina, país em que os casos de LV humana começaram a surgir a partir de 2005 e que nestes últimos anos não pararam de crescer, com aumento gradativo no número de casos e de óbitos mostrando assim a força de expansão e urbanização dessa doença (Salomón & Orellano, 2005; Salomón *et al.*, 2008; Salomón *et al.*, 2009).

No Brasil, seu controle é baseado em um tripé de ações, cujo resultado, surge apenas a médio ou longo prazo, e sem garantia de sucesso, na redução de LV humana (LVH) e canina (Palatnik *et al.*, 2001). Para que o controle seja realmente eficaz, as medidas devem ser mantidas durante longo período e, mesmo assim, é frequente a reativação dos focos da doença, uma vez que o combate ao vetor não tem logrado sucesso (Alvar *et al.*, 2004).

O processo de expansão geográfica e urbanização da LV tem levado à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle. Hoje as estratégias de controle são centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, redução da população de flebotômíneos no peri e intradomicílio, eliminação dos reservatórios (eutanásia de cães infectados) e atividades de educação em saúde (Elkhoury, 2005). Além disso, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) busca uma melhor definição das áreas de transmissão ou áreas de risco e propõe ações de vigilância para os municípios considerados silenciosos (Tesh, 1995; Elkhoury, 2005).

Epidemias urbanas de LV são observadas em várias cidades do Brasil e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS, à semelhança do que se observa no sul da Europa. De 2001 a 2005 foram notificados 16.210 casos de LV no Brasil, sendo que 315 (2%) destes apresentavam co-infecção com HIV (Elkhoury *et al.*, 2007). Um dos possíveis motivos desta elevada prevalência HIV/*Leishmania*, é a expansão simultânea da LV para o ambiente urbano e do HIV/AIDS para o meio rural, levando a

uma sobreposição de áreas geográficas, favorecendo os casos de co-infecção (Alves & Bevilacqua 2004). Além disso, a expansão da epidemia acometendo grupos de indivíduos jovens ou com co-morbidades tem ocasionado número elevado de óbitos. No período compreendido entre os anos de 1990 a 2006 foram notificados 50.060 casos, com média anual de 3.352 registros e incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes, apresentando tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (Elkhoury 2005; Maia-Elkhoury et al., 2008; Romero & Boelaert 2010). Segundo Costa (2008), ocorrem cerca de 200 a 300 óbitos anuais devido a LV no Brasil. Desta forma, observa-se que a letalidade da LV no Brasil apresenta tendência crescente, com níveis comparáveis aos encontrados em campos de refugiados no Sudão (Seaman et al., 1996; Collin et al., 2004). O rápido processo de urbanização do parasito, a expansão da epidemia de AIDS, o acometimento de grupos vulneráveis em consequência da grande força de transmissão da infecção e o diagnóstico tardio são condições possivelmente relacionadas a este desfecho desfavorável. Os fatores de risco para o óbito em pacientes com LV não são suficientemente conhecidos, mas as infecções bacterianas e os distúrbios da coagulação têm sido identificados como os mais importantes preditores do mau prognóstico (Seaman et al., 1996; Pastorino et al., 2002; Werneck et al., 2003). Dessa forma, a identificação precoce dos pacientes que apresentam um prognóstico ruim é de fundamental importância na tentativa de se reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas terapêuticas e profiláticas eficazes no âmbito da Leishmaniose visceral (MS, 2006a, 2006b).

Sendo assim, devido as altas taxas de morbimortalidade, e por afetar desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas, a OMS considera o controle da LV como prioridade máxima. Por isso, tem realizado importante esforço ao longo das últimas décadas através do “Programa Especial para Investigação e Treinamento em Doenças Tropicais – TDR”, (UNPD/WORLD BANK/WHO) incentivando e financiando pesquisas que viabilizem avanços nas áreas de diagnóstico, controle e tratamento, quer seja para a descoberta de novos produtos, fármacos e formulações, vacinas ou técnicas, quer seja pela melhora na qualidade das metodologias diagnósticas e de tratamento já existentes (WHO, 2010).

2.2 - Cão como modelo experimental na LV: aspectos imunopatológicos

No contexto da leishmaniose visceral, os cães (*Canis familiaris*) ocupam uma posição de destaque na cadeia epidemiológica de transmissão da doença. Este fato ocorre, devido à proximidade destes animais com o homem no ambiente doméstico principalmente em áreas rurais e urbanas (Deane & Deane, 1955; Tesh, 1995). Além disso, os cães apresentam elevado parasitismo cutâneo observado até mesmo nos animais assintomáticos que são considerados, dessa maneira, os principais reservatórios domésticos do parasito (Deane & Deane, 1955; Deane, 1961; Moreno & Alvar, 2002; Giunchetti et al., 2006; de Queiroz et al., 2011). Alguns autores sugerem que dentre os cães infectados que não exibem sinais clínicos da doença, cerca de 20% apresentam parasitos na pele (Alvar et al., 2004; Baneth et al., 2008). Dessa forma, o cão representa uma abundante fonte de infecção para os hospedeiros invertebrados, sendo encontrado em todos os focos da doença humana, caracterizando o principal elo na cadeia de transmissão da LV (Deplazes et al., 1995; Maia et al., 2010).

A leishmaniose visceral canina (LVC), assim como a LVH apresenta-se como uma doença complexa, caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas e variados graus de gravidade. Esta complexidade faz com que, ainda hoje, mais de cem anos após sua descoberta, não haja completo consenso científico sobre o seu manejo (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011). Diversos fatores estão associados ao perfil de resistência e susceptibilidade destes animais para desenvolver ou não a doença em suas formas assintomática e sintomática, respectivamente. A idade, nutrição, genética, comorbidades, carga parasitária, virulência da cepa de *Leishmania* e infecções anteriores, contribuem para o aparecimento e expressão das manifestações clínicas da forma ativa da LVC (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009; Reis et al., 2009).

Assim como na LVH, o cão pode desenvolver uma série de manifestações clínicas da doença, variando desde animais aparentemente sadios (assintomáticos), passando por uma fase "intermediária" com sinais moderados como pequena perda de peso, adenopatia linfóide e pêlo opaco (oligosintomáticos), podendo atingir estágios graves da doença, com intenso parasitismo cutâneo, diferentes alterações clínicas na pele (alopecia, dermatite furfurácea, úlceras e hiperqueratose), ceratoconjuntivite, onicogrifose, paresia dos membros posteriores, emagrecimento e caquexia (sintomáticos) (Mancianti et al., 1988; Abranches et al., 1991; Costa et al., 1999; Reis, 2001; Reis et al., 2006a, 2006b, 2006c; Giunchetti et

al., 2006; Reis et al., 2009). Além dos sinais clínicos clássicos, estes animais podem apresentar alterações laboratoriais do tipo hematológicas e bioquímicas com aumento sérico das enzimas hepáticas (ALT ou TGO e AST ou TGP), elevação da uréia e creatinina, diminuição de albumina sérica e da razão albumina/globulina além de anemia normocítica/normocrômica com diminuição da contagem global de hemácias e hemoglobina (Giunchetti, 2004; Reis et al., 2006b; Giunchetti et al., 2008b; Trópia de Abreu et al., 2011; Freitas et al., 2012). Desta forma, tem sido observado que o agravamento dos sinais clínicos no cão apresenta relação direta com a carga parasitária em diferentes tecidos (Giunchetti, 2004; Reis et al., 2006a, 2006b, 2006c; Giunchetti et al., 2006, Lage et al., 2007; Giunchetti et al., 2008b; Reis et al., 2009; Guerra et al., 2009; Coura-Vital et al., 2011).

Por ser uma doença sistêmica, inicialmente a LV é caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, que parecem estar diretamente correlacionados com a resposta imune estabelecida pelo hospedeiro. Do ponto de vista da resposta imune humoral é importante salientar que a LVC é marcada pela ativação policlonal de linfócitos B com conseqüente elevação na produção de todas imunoglobulinas (IgM, IgA, IgE, IgGs) (Abranches et al., 1991; Genaro, 1993; Reis, 2001; Reis et al., 2006a, 2006c; Giunchetti et al., 2008b). No entanto, não existe até o momento um consenso na literatura em relação ao subtipo de imunoglobulina anti-*Leishmania* que poderia estar associada a um perfil de resistência/susceptibilidade na LVC (Day, 2007). Entretanto, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa relatam em cães assintomáticos, presença predominante de IgG1 associada a uma menor frequência de carga parasitária em diversos tecidos. Por outro lado, cães sintomáticos apresentariam elevada produção de imunoglobulinas (IgG2, IgA, IgM e IgE) (Reis et al., 2006a, 2006c). A presença marcante de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática indicaria uma possível associação dessa forma clínica com a resposta imune do tipo 2 no hospedeiro, caracterizando um mau prognóstico da doença (Pinelli et al., 1994a; Reis et al., 2006c).

No âmbito da avaliação da resposta celular, o quadro hematológico (hemograma) de cães sintomáticos apresenta marcante anemia associada a intensa leucopenia em relação aos cães assintomáticos (Reis et al., 2006a). Resultados semelhantes são observados em cães agrupados de acordo com a carga parasitária da medula óssea, sendo observado anemia, linfocitopenia e monocitopenia em cães com alta carga parasitária quando comparados aos cães não infectados e com baixo parasitismo (Reis et al., 2006b; Guerra et

al., 2009). Estes resultados indicam que a progressão clínica da LVC, bem como o aumento do parasitismo na medula óssea induz a um grave quadro hematológico de repercussão sistêmica levando a imunossupressão celular contribuindo de forma marcante na gravidade da infecção e em sua evolução ao óbito. Já na doença humana, as manifestações hematológicas são comuns e, junto às infecções bacterianas, constituem os mais importantes fatores de risco para a morte (Pastorino et al., 2002; Werneck et al., 2003; Oliveira et al., 2006). As anormalidades mais freqüentemente relatadas incluem anemia, leucopenia, plaquetopenia, síndrome hemolítica e alterações do sistema de coagulação sanguínea (Singh et al., 1999; Kotwal et al., 2000; Mishra et al., 2004).

Alguns trabalhos relacionam a sintomatologia da LVC com alterações imunológicas envolvendo principalmente células T. Essas mudanças incluem debilidade na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) para antígenos de *Leishmania* (Cardoso et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2000) e diminuição do número de células T (CD5⁺, CD3⁺ ou Thy-1⁺) no sangue periférico (Pinelli et al., 1994a; De Luna et al., 1999; Reis et al., 2006b).

Neste sentido, estudos buscando relacionar o grau de comprometimento clínico e alterações no perfil de resposta imune celular na LVC foram desenvolvidos pioneiramente por Pinelli et al. (1994a), Pinelli et al. (1994b), Pinelli et al. (1995), Pinelli, (1997) e Pinelli et al. (1999). Estes estudos permitiram propor uma associação entre um perfil de resposta relacionado à resistência em cães assintomáticos, caracterizado pela produção de citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ . Além disso, foi observado que cães sintomáticos produziam citocinas como IL-4 e IL-10, indicando uma possível participação destes mediadores no desenvolvimento de manifestações clínicas da doença.

Posteriormente, Andrade et al. (1999) demonstraram que a resposta linfoproliferativa em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) frente a estímulo específico *in vitro* por antígeno de *Leishmania* é um importante marcador para avaliação de resistência/susceptibilidade na LVC visto que, apenas cães assintomáticos apresentam atividade proliferativa quando as CMSP são estimuladas. Tem sido descrito ainda que o aumento da atividade linfoproliferativa na LVC estaria associada a produção de IFN- γ que induziria a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e a lise de macrófagos infectados (Ruitenberget al., 2001). Já em cães sintomáticos estes autores relataram uma resposta imune celular caracterizada principalmente pela queda na população de linfócitos T CD4⁺ e marcada redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antigênico-

específico, sem produção significativa de IFN- γ e conseqüentemente, menor ação de linfócitos T CD8⁺ em promover a lise de macrófagos infectados (Ruitenber et al., 2001).

A análise do perfil de citocinas também tem contribuído para a melhor compreensão de mecanismos imunopatológicos na LVC. Neste sentido, trabalhos realizados por Quinnell et al. (2001) e Santos-Gomes et al. (2002) demonstraram que cães naturalmente infectados por *L. infantum* expressam maiores níveis de IFN- γ , sem apresentarem aumento da expressão de IL-4, IL-18 e IL-10. Chamizo et al. (2005) avaliaram de forma semi-quantitativa a expressão de citocinas em CMSP de cães experimentalmente infectados com *L. infantum* e observaram que a expressão de TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-10 e IL-18 foi semelhante à aquela observada em cães não infectados. Apenas a expressão de IL-4 foi detectada em níveis inferiores no grupo de cães assintomáticos. Já Lima et al. (2007) demonstraram no soro de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando a doença ativa, que a citocina IL-6 está presente em maiores concentrações quando comparado com animais não infectados. Já TNF- α foi encontrada em níveis semelhantes em ambos os grupos (Lima et al., 2007). Em trabalho mais recente, Boggiatto et al (2010) observaram que em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, um bom prognóstico clínico está relacionado com aumento na produção de IFN- γ , de anticorpos da classe IgG e aumento gradativo na resposta linfoproliferativa antígeno-específica em CMSP. Esses mesmos autores observaram ainda que, a gravidade da doença está relacionada ao aumento marcante na produção de IL-10, citocina chave na indução de morbidade da doença humana (Nylén & Sacks, 2007), e PCR+ para *Leishmania* no sangue destes animais.

Corroborando com estes resultados, Lage et al. (2007) ao avaliarem o perfil de citocinas expressas por esplenócitos durante o processo de infecção natural por *L. infantum* observaram aumento da expressão de IL-10 em cães com alta carga parasitária sendo esta expressão de IL-10 correlacionada positivamente com a progressão clínica da LVC. De forma interessante o aumento do parasitismo foi correlacionado tanto com a expressão de IL-10 como de IFN- γ . Desta forma foi proposto que a evolução clínica na leishmaniose visceral canina é marcada por produção balanceada de citocinas do tipo 1 e 2, com expressão predominante de RNAm de IL-10 e IFN- γ que estão relacionados à intensidade parasitária (Lage et al., 2007).

Mais recentemente o uso de cães naturalmente infectados com *L. infantum* reforçou o emprego deste modelo em estudos relacionados a imunopatologia e a definição de

possíveis perfis de resistência/susceptibilidade na doença (Figura 1). Tais estudos propõem biomarcadores que passaram a ser fundamentais nas avaliações terapêuticas e imunoprolifáticas que empregam esse modelo experimental (Reis, 2001; Santos-Gomes et al., 2003; Giunchetti et al., 2006; Reis et al., 2006a; Reis et al., 2006b; Reis et al., 2006c; Lage et al., 2007; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Reis et al., 2009; Reis et al., 2010; Alexandre-Pires et al., 2010; Nieto et al., 2011).



Figura 1: Biomarcadores de resistência e susceptibilidade nas diferentes formas clínicas da LVC conforme Reis et al., 2010.

Tendo em vista o exposto anteriormente em relação a imunopatologia da LVC e considerando ainda a grande proximidade genética do cão com o homem quando comparada a outros modelos (Starkey et al., 2005), tem sido proposto que ensaios pré-clínicos neste modelo experimental seriam a melhor estratégia para o estudo de novas abordagens terapêuticas aplicadas a LV humana (Santos-Gomes et al., 2003; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Reis et al., 2009; Reis et al., 2010; Nieto et al., 2011). Ademais, o cão ocupa papel central como o principal hospedeiro e reservatório doméstico da *L. infantum* apresentando sinais clínicos extremamente semelhantes à doença humana. Além disso, é possível observar uma forte sobreposição de biomarcadores laboratoriais de prognóstico e monitoramento da LVH e LVC para ambas morbidades nestes distintos hospedeiros. Assim, é verificado que cães e humanos apresentam um quadro hematológico extremamente semelhante na história natural da LV marcado principalmente por: leucopenia (linfopenia, monocitopenia e eosinopenia) na forma sintomática da doença. Somado a estes fatores, é possível observar que ambos apresentam queda nos valores de hemoglobina e hematócrito evoluindo para anemia normocítica normocrômica com queda na contagem global de hemácias (Lainson & Shaw, 1978; Carvalho et al., 1981; Badaró et

al., 1986; Kotwal et al., 2000; Collin et al., 2004; Reis et al. 2006; Reis et al., 2009). Além de todos estes biomarcadores hematológicos destaca-se a trombocitopenia presente nas formas graves de LV destes hospedeiros. Adicionalmente, biomarcadores relacionados ao quadro bioquímico relacionados a função hepática e renal também se repetem na LVC e LVH (Abdelmoula et al., 2003; Werneck et al., 2003; Reis et al. 2006; Reis et al., 2009).

Dessa forma, estudos neste modelo experimental seriam uma excelente alternativa considerando não apenas a avaliação de eventos imunopatológicos, como também, a triagem de imunofármacos e/ou imunobiológicos com potencial de aplicabilidade a indivíduos apresentando leishmaniose visceral em sua forma mais grave.

2.3 - Tratamento das Leishmanioses: Quimioterapia e Imunoterapia

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses têm sido até hoje os antimoniais pentavalentes ($Sb5^+$) (Roberts et al., 1998; Murray, 2000; Soto et al., 2005). Estes foram descobertos e usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente – $Sb3^+$), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio). Entre 1920 e 1930 os $Sb5^+$ foram introduzidos na terapêutica da LV, o que fez decair o período de tratamento de 3-4 meses para algumas semanas (Murray, 2000). Posteriormente, na década de 1940 surgiram novas formulações dos $Sb5^+$, tais como estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]). Apesar de mais de sete décadas de uso, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo enzimas da via glicolítica e também da via oxidativa de ácidos graxos do parasito (Berman, 1988). Ainda hoje não existe terapia ideal para as leishmanioses, contudo esta classe de fármacos apresenta-se como a mais barata opção terapêutica disponível (Herwaldt, 1999). Apesar de sua comprovada eficácia, estes fármacos apresentam sérios problemas como efeitos colaterais graves (hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotóxicos) (Oliveira et al., 2004), longo período de terapia, administração parenteral e efetividade diminuída devida à resistência de cepas em determinadas regiões do planeta como Bihar na Índia no qual quase 60% da população apresenta falha terapêutica com este medicamento (Sundar, 2001; Dube et al., 2005). Por seus efeitos tóxicos graves, os antimoniatos não são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da leishmaniose em pacientes nos

EUA (Buates & Matlashewski, 1999) sendo apenas a anfotericina B lipossomal o medicamento aprovado para uso (Meyerhoff, 1998).

Além dos antimoniais, a anfotericina B desoxicolato tem sido considerado um poderoso fármaco com poder leishmanicida (Berman et al., 1986; Sundar et al., 2004). Ela é a mais potente das drogas anti-*Leishmania* disponível, com efeito demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Na LV, a anfotericina B foi usada pela primeira vez por Prata, em 1960 (Prata, 1963). Entretanto seu uso na leishmaniose visceral humana tem sido limitado por produzir inúmeros efeitos colaterais graves com destaque para insuficiência renal que pode levar o paciente ao óbito (Gallis, Drew & Pickard, 1990). Dano renal temporário ocorre em praticamente todos os doentes, podendo tornar-se permanente em percentuais que variam de 15 a 80% dos casos, quando a dose total chega a 30 e 75 mg/kg de peso, respectivamente. Hipocalemia, hipomagnesemia, neurotoxicidade, acidose tubular renal e cardiotoxicidade também podem ser vistos (Hoeprich, 1992; Thakur et al., 1993; Thakur & Narayan, 2004). Além disso, a necessidade de um tratamento prolongado, o monitoramento das funções renais e dosagem nos níveis de eletrólitos sanguíneos permanecem como as principais desvantagens no tratamento com a anfotericina B desoxicolato (Sundar et al., 2004). Apesar de seu efeito leishmanicida potente, o Ministério da Saúde contra indica o tratamento de pacientes com LV utilizando anfotericina B desoxicolato devido a sua elevada toxicidade (MS, 2013).

Já a anfotericina B lipossomal que apresenta taxas de cura de 97%, comercialmente conhecida como AmBisome®, é utilizada como droga de segunda escolha na terapêutica da leishmaniose visceral, principalmente por causa do seu alto custo. Esse fármaco apresenta características peculiares como tempo reduzido de tratamento (3-5 dias), reduzida toxicidade comparada a anfotericina B desoxicolato sendo altamente efetiva no tratamento da LVH (Murray, 2001, Sundar & Chatterjee, 2006; Sundar et al., 2007; Sundar et al., 2008; Sundar et al., 2010). O Ministério da Saúde do Brasil recomenda a dose de 3 mg/kg/dia durante sete dias ou 4 mg/kg/dia durante cinco dias, por via parenteral (MS, 2006a; 2006b). O custo, porém, é elevado, o que pode dificultar seu uso em saúde pública. Por isso, orienta-se a sua utilização restrita aos pacientes que tenham apresentado falha terapêutica ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal (MS, 2006a; 2006b). Além disso, o Ministério da Saúde ampliou a utilização da anfotericina B lipossomal no Brasil devido à elevada toxicidade da anfotericina B desoxicolato (MS, 2013).

Atualmente, em diversas regiões endêmicas principalmente na África, o miltefosine apresenta-se como alternativa para o tratamento da LV, tendo a vantagem de ser administrado por via oral (Sundar et al., 1998; Jha et al., 1999; Sindermann et al., 2004). Hexadecilfosfocolina ou miltefosine é um alquilfosfocolina desenvolvido originalmente para o tratamento do câncer (Unger et al., 1989). O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com LV refratários ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores (Sindermann et al., 2004). Além disto, o miltefosine apresenta-se como importante alternativa para o tratamento da LV, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral e apresenta efeitos colaterais leves como diarreia e vômitos (Sundar et al., 1998; Jha et al., 1999; Bhattacharya et al., 2007). Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* e *L. infantum* (Croft et al., 1996; Lê Fichoux et al., 1998). O mecanismo de ação destes fármacos, ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, sabe-se que eles atuam na inibição seletiva de enzimas do parasito, requeridas na via glicolítica e na oxidação de ácidos graxos.

No Brasil, os antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha para o tratamento da LV (Santos et al., 2002). A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes (MS, 2006a; 2006b). Atualmente, a anfotericina B lipossomal é recomendada aos pacientes que tenham apresentado falha terapêutica ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B, transplantados renais ou pacientes com insuficiência renal além de pacientes apresentando LV grave. Além da utilização dos fármacos descritos, o paciente apresentando a forma grave da LV, deve ser assistido com antibiótico-profilaxia/terapia sendo que, na maioria dos casos, deve ser associada a um suporte hemoterápico com administração de concentrado de hemácias (hemoglobina <7g/dL ou hematócrito <21%), concentrado de plaquetas (plaquetas <20.000/mm³ ou sangramentos associados a plaquetopenia), plasma fresco congelado, vitamina K e suporte nutricional. Além disso, é recomendado ao paciente que apresenta quadro de neutropenia grave, a administração concomitante de fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF) (3-5µg/Kg/dia pela via subcutânea). Dessa forma, o uso da imunoterapia utilizando vacinas terapêuticas e/ou moduladores imunológicos, seria uma ferramenta acessória de grande importância para resolução de casos de leishmaniose visceral grave

auxiliando na diminuição da morbidade, letalidade e redução nos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e no tempo de tratamento.

A utilização da imunoterapia bem como da imunoquimioterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, principalmente nas formas mais graves da Leishmaniose (Badaro et al., 1990; Convit et al., 2004; Musa et al., 2010). Dentre as alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento da LV estão: 1) imunoterapia utilizando-se vacinas terapêuticas ou imunomoduladores tais como citocinas e/ou anticorpos anti citocinas e/ou anticorpos anti receptores de citocinas; 2) associação de fármacos ou mesmo de imunofármacos; 3) a imunoquimioterapia, que pode ser empregada associando vacinas terapêuticas/imunomoduladores e fármacos concomitantemente (Murray et al., 2002; Santos, et al., 2007; Miret et al., 2008; Borja-Cabrera et al., 2010; Musa et al., 2010; Gautam et al., 2011).

Os primeiros relatos do uso da imunoterapia aplicada as leishmanioses iniciou-se em meados do século 20 quando Row em 1912 tratou com sucesso 3 pacientes apresentando lesões ativas de leishmaniose cutânea (*Oriental sore*) com uma vacina composta por promastigotas mortas de *Leishmania tropica*. Anos depois, Dubovsky em 1943 relatou sua experiência ao submeter 38 pacientes com leishmaniose cutânea (*Oriental sore*) a imunoterapia usando uma preparação de promastigotas mortas de *Leishmania*. Dos 38 pacientes submetidos a imunoterapia, 22 (58%) foram curados.

Desde então, diversos pesquisadores têm utilizado vacinas terapêuticas como estratégias para o tratamento das leishmanioses. Neste sentido, as formas tegumentares das leishmanioses são os principais alvos de estudo de imunoterapia bem como imunoquimioterapia e poucos são os estudos aplicados para a leishmaniose visceral humana (Badaró et al., 1990; Squires et al., 1993; Sundar et al., 1995; Sundar et al., 1997).

Convit et al. (1987) na Venezuela, compararam o uso de vacina de lisado de *L. mexicana amazonensis* associado ao adjuvante BCG *versus* a quimioterapia com glucantime, no tratamento de pacientes humanos com leishmaniose cutânea localizada confirmada, demonstrando 94% de taxa de cura nos grupos tratados com este imunoterápico. Estes autores ainda demonstraram que dos 5341 pacientes tratados com a vacina de lisado de *L. mexicana amazonensis* associada ao BCG, o percentual de cura foi altíssimo variando de 91,2 a 98,7% em 4 diferentes regiões da Venezuela entre os anos de 1990-1999 (Convit et al., 2003).

No Brasil, Mayrink et al., (1992) ao avaliar a imunoterapia utilizando uma vacina composta por uma mistura de cinco cepas de *Leishmania*, alcançaram 76% de cura em indivíduos com leishmaniose cutânea. Machado-Pinto et al., (2002) avaliaram em pacientes humanos de Minas Gerais um protocolo de imunoquimioterapia utilizando a vacina composta por formas promastigotas mortas de *L. (L.) amazonensis* associada ao tratamento com Glucantime® na metade da dose preconizada de uso. Após quatro séries completas do tratamento proposto, 100% (47/47) dos pacientes que receberam imunoquimioterapia apresentaram-se curados com as lesões cicatrizadas, enquanto o grupo controle, que havia recebido placebo associado ao Glucantime®, 8,2% (4/49) apresentaram cura clínica. Mayrink et al., (2006) utilizaram uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis*, em ensaio clínico humano composto por 542 pacientes de área endêmica para leishmaniose tegumentar em Minas Gerais. Foi observado neste estudo que os pacientes tratados com a imunoterapia (n=53) (vacina de *L. amazonensis* + BCG) apresentaram 98,1% de cura clínica, mesmo índice de cura encontrado nos pacientes tratados com a imunoquimioterapia e com quimioterapia convencional (100%). Foi encontrada ainda redução no volume total do fármaco usado (17,9%) e diminuição no tempo do tratamento, que durava em média 94,6 dias em pacientes tratados somente com quimioterapia para 64,7 dias, em pacientes tratados com imunoquimioterapia. Dessa forma, este estudo demonstrou que a imunoterapia empregando vacinas terapêuticas surge como ferramenta importante para o tratamento das leishmanioses com redução drástica nos efeitos colaterais causados pelo tratamento com os fármacos convencionais (Glucantime®) além de redução considerável no tempo de tratamento (Mayrink et al., 2006).

Além de vacinas com aplicabilidade no campo da imunoterapia contra as leishmanioses, outros imunobiológicos tem sido empregados no tratamento destas doenças. Dentre estes, citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), imunomoduladores como Imiquimod® e anticorpos monoclonais contra citocinas ou mesmo contra seus receptores podendo ser associados ou não à quimioterapia convencional (Badaro et al., 1990; Murray et al., 2002; Almeida et al., 2005; Firooz et al., 2006). Neste sentido, é consenso na literatura que a citocina imunomodulatória IL-10 está envolvida na suscetibilidade a infecção por *Leishmania*, desencadeando mecanismos imunológicos responsáveis pela patogênese da LV (Ghalib et al., 1993; Belkaid et al., 2001; Bhattacharya et al., 2001; Nylén & Sacks, 2007; Gautam et al., 2011). De forma semelhante, na LVC essa citocina está diretamente relacionada a um

prognóstico de gravidade da doença (Figura 1). Dessa maneira, essa citocina atuaria de forma marcante, em diversos contextos da resposta imune do hospedeiro, dentre elas: (i) comprometendo a apresentação de antígenos pelas APCs, (ii) inibindo os mecanismos de co-estimulação e proliferação de células T (iii) inibindo a secreção/produção de citocinas do tipo 1 e (iv) bloqueando a ativação macrofágica (Bogdan et al., 1991; Cenini et al., 1993; Ghalib et al., 1993; Karp et al., 1993; Miralles et al., 1994; Gassim et al., 1998; Barcellar et al., 2000; Belkaid et al., 2001; Bhattacharya et al., 2001; Moore et al., 2001; Murray, et al., 2002; Nylén & Sacks, 2007; Gautam et al., 2011).

Neste sentido alguns pesquisadores têm avaliado o emprego de anticorpos anti receptores de IL-10 como uma estratégia terapêutica na leishmaniose visceral (Murray et al., 2002). Estudos realizados em modelos murinos apontam para esta possibilidade de forma animadora o que tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa em avaliar esta estratégia terapêutica bem como a sua associação com outros imunobiológicos (imunoterapia combinada) associada ou não a drogas leishmanicidas como o miltefosine, antimoniato pentavalente encapsulado e a anfotericina B lipossomal (imunoquimioterapia). Além disso, a OMS em reunião realizada em Madrid na Espanha com os principais pesquisadores em tratamento na leishmaniose recomendou o uso de terapias combinadas como uma das principais abordagens para impedir o surgimento de cepas resistentes do parasito (Croft et al., 2006) frente aos fármacos atuais bem como, o desenvolvimento de estratégias que visem reduzir a duração do tratamento aumentando os índices de cura (Position Paper, 2009; Musa et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou duas vacinas contra LVC, sendo uma composta por antígenos *Leishmania (Viannia) braziliensis* associada à saponina (LBSap) e a outra apresentando a mesma composição vacinal acrescida de extrato salivar de glândulas de *L. longipalpis* (LBSapSal) (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti, 2007; Giunchetti et al., 2008a; Roatt et al., 2012). Estas vacinas têm demonstrado forte imunogenicidade em cães, tanto no âmbito da resposta celular quanto humoral, sendo atualmente consideradas como fortes candidatos vacinais contra a LVC (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti, 2007; Giunchetti et al., 2008a; Roatt et al., 2012). Estudos realizados por Giunchetti et al. (2007) mostraram que a LBSap induz intensa reação imunogênica, caracterizada por elevados níveis de anticorpos IgG total e das subclasses (IgG1 e IgG2) anti-*Leishmania*, expansão de linfócitos TCD8⁺ circulantes bem como aumento de linfócitos TCD8⁺ antígeno-específicos, além de uma intensa atividade linfoproliferativa e

elevada produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. Além disso, Roatt et al., (2012) observaram que cães imunizados com a vacina LBSap e submetidos ao desafio intradérmico com *L. infantum* apresentaram expansão de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ circulantes, intensa atividade linfoproliferativa, aumento da expressão de IFN- γ no baço e redução da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β e da carga parasitária neste tecido. Também foi observado que a vacina composta apenas pelo antígeno de *L. braziliensis* foi capaz de estimular o aumento na expressão de IFN- γ e reduzir a carga parasitária no baço em 40% quando comparado ao grupo de animais controle (Roatt et al., 2012). Dessa forma, pelo potencial imunoprotetor apresentado pela vacina LBSap induzido pelo antígeno LB, nosso grupo de pesquisas propôs avaliar o potencial terapêutico de uma vacina contendo o antígeno LB anteriormente citado. Assim, a combinação do antígeno vacinal LB com adjuvantes licenciados para uso humano, como o Monofosforil Lipídeo A (MPL ou MPL-A), caracteristicamente estimulador de uma resposta imune do tipo 1, torna esta formulação altamente promissora ao tratamento da LVH. Neste sentido, tornou-se relevante estudar o imunobiológico LBMPL em um ensaio pré-clínico em cães, buscando avaliar sua efetividade terapêutica. Vale ressaltar que o adjuvante MPL, já é utilizado na Europa como adjuvante componente da vacina contra a Hepatite B, Fendrix® (GlaxoSmithKline) e da vacina contra o vírus do papiloma humano, Cervarix® (GlaxoSmithKline) (Tong et al., 2005; Schiller et al., 2008) e recentemente foi aprovada sua utilização pelo FDA para uso nos EUA como imunomodulador na terapia contra o câncer (Vacchelli et al., 2012).

Dessa forma, a avaliação de novas propostas terapêuticas imunofarmacológicas que possam ser empregadas no tratamento da LVH torna-se fundamental. Neste sentido, este trabalho se propôs avaliar a imunoterapia utilizando a vacina terapêutica composta por antígenos totais de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (LBMPL) no tratamento para a leishmaniose visceral, empregando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* e sintomático como modelo experimental.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser menos conhecida ou reconhecida, recentemente tornou-se público que a Leishmaniose Visceral 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). Além disso, o tratamento de escolha desta doença emprega a mesma droga utilizada desde o início do século passado, extremamente tóxica, e que já vem apresentando diferentes níveis de eficácia em várias regiões do mundo. Na busca por novas drogas e novas estratégias terapêuticas (imunofármacos), alguns modelos experimentais têm sido utilizados em estudos pré clínicos. Assim, tem sido investigado um modelo mais adequado que atenda aos testes de drogas direcionando efetivamente para ensaios clínicos em humanos. Consensualmente, o cão é considerado o melhor modelo experimental a ser empregado em ensaios pré clínicos para LV humana, pois apresenta características clínico-patológicas além de uma história natural da doença extremamente semelhantes o que resulta em inúmeros perfis de biomarcadores laboratoriais comuns.

Tendo em vista o surgimento de complicações no decorrer do tratamento da LV com fármacos de primeira escolha (antimoniais pentavalentes), casos de leishmaniose visceral grave, existência da co-infecção HIV/*Leishmania infantum* além de outras comorbidades seja por doenças e/ou por desnutrição onde é necessário o tratamento destes pacientes por tempo prolongado, surge a necessidade da avaliação de novas estratégias terapêuticas para LV. Nesse sentido, o emprego de imunofármacos tais como vacinas preventivas e/ou terapêuticas, imunomoduladores e outros imunobiológicos, surgem como alternativa extremamente importante para os casos de LV grave ou mesmo em pacientes resistentes as quimioterapias convencionais.

Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar o efeito terapêutico da vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (LBMPL) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* contribuindo: (i) na construção de um esquema de imunoterapia eficaz para o tratamento da LV grave, (ii) no estabelecimento de parâmetros imunofarmacológicos através de biomarcadores hemato-bioquímicos e imunológicos, (iii) na avaliação da redução da carga parasitária como critério de cura (iv) e na proposição de futuros ensaios clínicos em humanos vislumbrando um horizonte a médio prazo onde a imunoterapia possa ser efetivamente mais uma alternativa e uma estratégia farmacológica aplicada aos casos de LV grave cada vez mais frequentes em nosso país.

4. OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Avaliar o potencial imunoterapêutico da vacina LBMPL para a leishmaniose visceral humana, empregando o cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum* como modelo de ensaio experimental pré-clínico.

4.2 - Objetivos específicos

Para cumprir com o objetivo geral proposto, foram definidos alguns objetivos específicos que estão descritos a seguir. É importante salientar que as principais avaliações deste estudo foram realizadas antes do início do protocolo de imunoterapia (denominado T0) e nos tempos de T15, T30 e T90 dias após completado o protocolo de imunoterapia que correspondem a 75, 90 e 150 dias de acompanhamento total dos animais. Sendo assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ❖ Investigar o perfil hematológico (leucograma e eritrograma) por hemograma automatizado e contagem diferencial de leucócitos;
- ❖ Avaliar o quadro bioquímico (funções hepática e renal) por métodos bioquímicos;
- ❖ Avaliar a frequência de linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺), monócitos (CD14⁺) e células NK (CD5⁻CD16⁺) do sangue periférico por citometria de fluxo - *ex vivo*;
- ❖ Determinar a atividade linfoproliferativa e frequência imunofenotípica de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;
- ❖ Determinar o perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-4) em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺;
- ❖ Determinar a cinética das citocinas (TNF- α e IL-10) por ELISA em sobrenadante de cultura de CMSP;
- ❖ Avaliar a evolução clínica dos cães através de *score* clínico;
- ❖ Avaliar as alterações esplênicas através de ultrassom;
- ❖ Determinar a carga parasitária por PCR em tempo real em diversos órgãos (pele, baço e medula óssea).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante MPL

O imunobiológico desenvolvido para este trabalho que constitui a vacina terapêutica LBMPL, foi elaborada 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 em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM[®] modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C. Para obtenção do antígeno vacinal, a cultura foi expandida a partir de um inóculo inicial de 10 mL de meio LIT contendo entre 10⁷ a 10⁸ promastigotas/mL de *L. braziliensis* em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura NNN/LIT, distribuído sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo acondicionado em seguida a temperatura de 23°C ± 1°C. Após 7 dias do inóculo inicial, foi realizado o primeiro repique, depois de constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, com auxílio do microscópio óptico, e distribuídos os 50 mL de cultura em 5 novos Erlenmeyers, nas mesmas condições do inóculo inicial (10 mL de cultura em 40 mL de meio NNN/LIT). Após 4 repiques consecutivos de expansão, foram obtidos 5.000 mL de cultura de promastigotas em fase estacionária de crescimento, na concentração aproximada de 1 x 10⁸ a 5 x 10⁸ 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), 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 0,85%), 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 ultrassom (Sonifier Cell Disruptor[®]- Branson Sonic Power Co. – EUA), por um minuto 40 Watts em banho de gelo. Após este procedimento, o antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a -80°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

O adjuvante de escolha utilizado associado ao antígeno de *L. braziliensis* foi o MPL (Monofosforil lipídeo A, obtido de *Salmonella enterica*, sorotipo Minnessota RE 595) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluído em água de injeção no momento das

inoculações, para evitar perda na estabilidade. A concentração tanto do antígeno vacinal quanto do adjuvante que foi usada no protocolo de tratamento será descrito posteriormente.

5.2 - Grupos Experimentais e manejo dos animais

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP (CETEA-UFOP) (ANEXO 1), conforme o protocolo nº 2010/57 em 05/11/2010.

Os animais foram mantidos no canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose do Centro de Ciência Animal - CCA da UFOP, que possui baias coletivas, com área coberta e aberta (solário), o que favorece a incidência de luz solar e ventilação adequada além de comedouros e bebedouros. Todo o canil, incluindo as áreas de solário, é recoberto por telas de aço inox AISI 304 fio 34, para impedir possível contato entre animais infectados por *L. infantum* e seu hospedeiro invertebrado natural.

Antes da alocação dos cães aos grupos foi realizado um procedimento conhecido por "vazio sanitário", que consisti na restrição à presença de qualquer animal nas baias por período mínimo de 30 dias, mais o tempo necessário para a realização dos procedimentos de desinfecção das instalações, totalizando 35-40 dias. A desinfecção química é realizada com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Hipoclorito de Sódio 10%, Sulfal Química Ltda, Brasil). Vinte e quatro horas antes da entrada dos animais no recinto as paredes internas e externas do canil e das baias, incluindo as telas protetoras, foram borrifadas com inseticida de poder residual a base de deltametrina, na dose de 25 mg/m² (K-Otrine CE25[®], Bayer Cropscience Ltda, Brasil).

O controle de *Lutzomyia longipalpis* e de outros insetos antes e durante a permanência dos animais no canil foi realizado pela aspersão trimestral com deltametrina 25 mg/m² nas paredes e telas, interna, externamente e no teto. Para evitar que este procedimento interfira no xenodiagnóstico dos animais (item 5.12), as borrifações subsequentes das paredes internas das baias foram realizadas a partir de um metro e meio de altura até o teto.

A limpeza das baias, além da alimentação dos animais, foi realizada por técnico paramentado com equipamentos de proteção individual (EPI) e devidamente treinado para tais tarefas. Os procedimentos de manejo dos animais, tratamentos terapêuticos e a coleta

de amostras biológicas, foram realizados pelo aluno de doutorado Bruno Mendes Roatt responsável pelo projeto.

Os animais foram distribuídos respeitando a lotação máxima de cinco cães por baia para atender as necessidades fisiológicas e comportamentais (micção e defecação, manutenção da temperatura corporal, movimentação e ajustes de postura), gênero, além da interação social coespecífica e desenvolvimento de hierarquias entre eles. A dieta durante todo o período experimental foi baseada em ração comercial balanceada do tipo Premium (Nero Refeição[®], Total Alimentos, Brasil), e água potável *ad libitum*.

5.3 - Critérios de inclusão e composição dos grupos experimentais

Ao todo, foram incluídos neste trabalho 16 cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* provenientes de área endêmica do estado de Minas Gerais (Governador Valadares), com presença de um ou mais sinais clínicos ao exame físico (sintomáticos), e resultados positivos nos testes sorológicos de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoenzimático (ELISA), associados ao teste parasitológico positivo pela cultura em NNN/LIT ou PCR em tempo real realizado em aspirado de medula óssea.

Os animais foram cedidos pelos proprietários após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (ANEXO 2). Os animais foram selecionados independentemente do sexo e da idade, preferencialmente de porte médio, com peso corpóreo máximo de 30Kg. O aluno responsável pelo projeto, Bruno Mendes Roatt, acompanhou os agentes da vigilância sanitária do CCZ Municipal de Governador Valadares, MG no momento do recolhimento dos animais e solicitou a doação do animal para compor os diferentes grupos experimentais. Todos os cães componentes deste estudo foram animais domésticos. Não foram utilizados animais vadios. Este trabalho contou com um convênio de cooperação técnica científica entre o Laboratório de Imunopatologia da UFOP e a Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Governador Valadares - MG representada pelo CCZ Municipal. Após recolhimento dos animais, estes foram trazidos e alocados no Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose (CETDVL) da UFOP. Ao chegar no canil da UFOP, cada animal foi fotografado e identificado pelas suas características zootécnicas, como tipo e coloração de pêlos, marcas naturais, gênero, e recebeu um número, que é anotado em um prontuário de avaliação individual (ANEXO 3). Estes animais foram submetidos a exame físico, e os

sinais clínicos compatíveis com LVC anotados também em prontuário utilizado para construção do *score* clínico (ANEXO 4). Além disto, os cães foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea para confirmação da presença do parasito através da cultura em NNN/LIT ou qPCR em tempo real.

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 coletada amostra de 1,0mL de conteúdo de medula óssea (Raskin & Beldner 1998). Cerca de 0,75mL deste material foi transferida 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 0,25mL foi transferido para dois tubos contendo NNN/LIT afim de se isolar o parasito.

Os animais foram alocados nas baias coletivas e submetidos a período de quarentena, em que receberam anti-helmíntico oral de largo espectro (Helfine cães[®], Agener União, Brasil) e imunização contra raiva (Defensor[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil). Estes animais tiveram tratamento específico empregando medicamentos anti-ectoparasitários a base de fipronil (Frontiline Top Spot[®], Merial, Brasil), fármaco que não interfere na realização do xenodiagnóstico destes cães (item 5.12), durante todo o período experimental.

Antes de cada coleta de material biológico ou dos exames físicos, a identificação dos animais foi confirmada com a ficha clínica preparada quando da alocação dos animais além do registro fotográfico dos animais e dos procedimentos.

Os cães foram então subdivididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais. O grupo submetido à imunoterapia com a vacina LBMPL foi composto por um total de 10

cães machos e/ou fêmeas sintomáticos e o grupo submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL (grupo controle) foi composto por um total de 6 cães machos e/ou fêmeas sintomáticos sendo que, cães sintomáticos graves em fase terminal não foram utilizados neste estudo.

5.4 - Protocolos de imunoterapia

Após a distribuição aleatória dos cães nos dois grupos experimentais, por meio de sorteio, os animais foram submetidos aos protocolos de imunoterapia descritos a seguir (Fluxograma 1):

➤ **Grupo Controle MPL (C)**: este grupo foi composto por seis cães (dois machos e quatro fêmeas) sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* que receberam, três séries apenas do adjuvante MPL em água de injeção, pela via subcutânea na região dorsal (cada série composta por 10 doses - 1 dose/dia), com intervalo de descanso de 10 dias entre cada série, distribuídas da seguinte forma:

1ª Série: foram administradas 10 doses do adjuvante MPL sendo 1 dose/diária em ordem crescente de concentração do adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL) (Sigma Co., E.U.A) idêntica a concentração administrada no grupo LBMPL. No primeiro dia foi administrada uma dose contendo 5µg de MPL em 100µL de água de injeção; segundo dia 10µg de MPL em 200µL de água de injeção; terceiro dia 15µg de MPL em 300µL de água de injeção; quarto dia 20µg de MPL em 400µL de água de injeção; quinto dia 25µg de MPL em 500µL de água de injeção; do sexto ao décimo dia desta série foram administrados diariamente uma dose contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção. Após a conclusão da primeira série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

2ª Série: foi iniciada 10 dias após a 1ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses (1 dose/diária), do primeiro ao décimo dia, contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente. Após a conclusão da segunda série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

3ª Série: foi iniciada 10 dias após a 2ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses, do primeiro ao décimo dia, contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente.

Após a administração das três séries os animais foram avaliados nos tempos de 15, 30 e 90 dias pós imunoterapia (equivalente a 75, 90 e 150 dias de acompanhamento total).

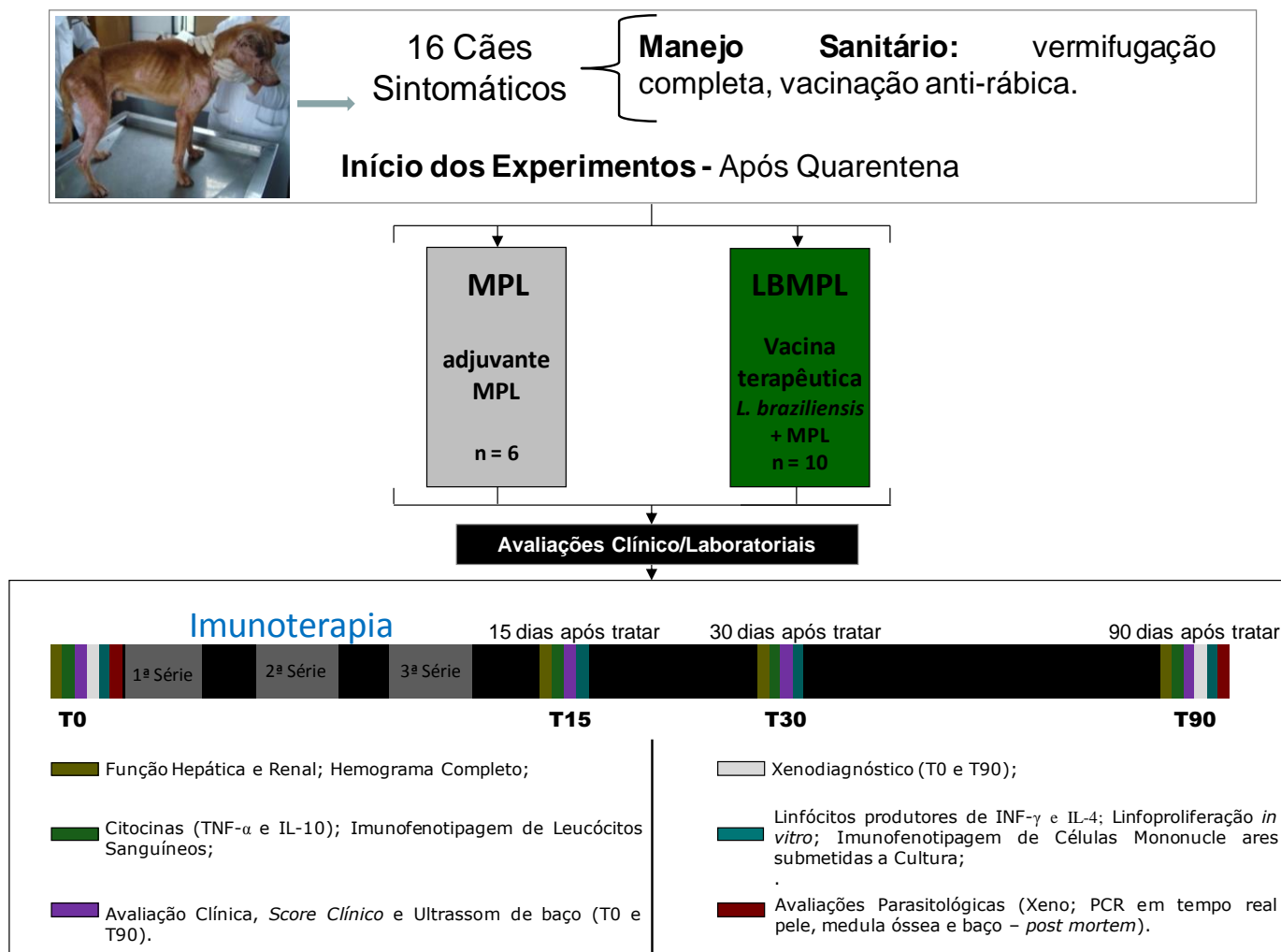
Grupo Vacina LBMPL (LBMPL): este grupo foi composto por dez cães (cinco machos e cinco fêmeas) sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* que receberam, três séries de imunoterapia pela via subcutânea na região dorsal (cada série composta por 10 doses - 1 dose/dia), com intervalo de descanso de 10 dias entre cada série, distribuídas da seguinte forma:

1ª Série: foram administradas 10 doses vacinais sendo 1 dose/diária em ordem crescente de concentração de antígeno de *L. braziliensis* e adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL) (Sigma Co., E.U.A). No primeiro dia foi administrada uma dose vacinal contendo 60µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 5µg de MPL em 100µL de água de injeção; segundo dia 120µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 10µg de MPL em 200µL de água de injeção; terceiro dia 180µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 15µg de MPL em 300µL de água de injeção; quarto dia 240µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 20µg de MPL em 400µL de água de injeção; quinto dia 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção; do sexto ao décimo dia desta série foram administrados diariamente uma dose contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção. Após a conclusão da primeira série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

2ª Série: foi iniciada 10 dias após a 1ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses vacinais (1 dose/diária), do primeiro ao décimo dia, contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente. Após a conclusão da segunda série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

3ª Série: foi iniciada 10 dias após a 2ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses vacinais, do primeiro ao décimo dia, contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente.

Após a administração das três séries os animais foram avaliados nos tempos de 15, 30 e 90 dias pós imunoterapia (equivalente a 75, 90 e 150 dias de acompanhamento total).



Fluxograma 1: Desenho experimental utilizado na avaliação dos diferentes protocolos imunoterápicos: grupo controle MPL (C) e grupo vacina de *L. braziliensis* associado ao adjuvante monofosforil lipídeo A (LBMP). T0 = tempo antes da imunoterapia; T15 = 15 dias após tratamento (75 dias de acompanhamento); T30 = 30 dias após tratamento (90 dias de acompanhamento); T90 = 90 dias após tratamento (150 dias de acompanhamento).

5.5 - Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma e provas bioquímicas

As amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL, através de punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos 5 mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados à realização do hemograma completo enquanto 10 mL foram transferidos para dois tubos sem anti-coagulante, destinados à realização das dosagens bioquímicas. O último tubo foi imediatamente centrifugado a 450 x g por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram, então, alíquotadas e encaminhadas para realização das provas bioquímicas. Alíquotas deste soro também foram congeladas à -80°C para análises posteriores.

5.6 - Avaliações laboratoriais e imunológicas

5.6.1 - Avaliação do quadro hematológico e provas bioquímicas

Para a avaliação do perfil hematológico, foi utilizado o aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) para a análise global de leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas. O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm³. A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov[®]) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão. Desta forma, foi determinado o número percentual de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina e posteriormente calculado o valor absoluto destas células a partir dos valores de leucócitos/mm³ obtidos com o aparelho.

Com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros hematológicos dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos aos diversos protocolos imunoterapêuticos propostos neste estudo, foi coletado sangue de 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses, do CCA-UFOP afim de estabelecer valores de referência para o leucograma e eritrograma (Tabela 1). Dessa maneira, foi possível comparar antes da imunoterapia (T0) e pós tratamento os parâmetros hematológicos dos animais em relação à faixa de valores de referência ou valores normais estabelecida com os valores obtidos dos cães SRD normais não infectados.

Tabela 1: Valores hematológicos de referência (Leucograma e Eritrograma) de 45 cães normais.

Parâmetros	Valores de Referência
Leucócitos (mm ³)	7.408 - 14.440
Neutrófilos (mm ³)	3.839 - 9.379
Eosinófilos (mm ³)	150 - 709,4
Linfócitos (mm ³)	2.299 - 5119
Monócitos (mm ³)	147 - 601
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	5,42 - 8,38
Hemoglobina (g/dL)	13,2 - 21,2
Hematócrito (%)	33,7 - 57,3
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	171 - 384

As avaliações bioquímicas 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 destes 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 o método descrito pelo fabricante.

Com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros de bioquímica sérica dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos aos protocolos imunoterapêuticos propostos neste estudo, foi coletado sangue de 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses, do CCA-UFOP afim de estabelecer valores de referência para função renal, hepática e proteinograma (Tabela 2).

Dessa maneira, foi possível comparar antes da imunoterapia (T0) e pós tratamento os parâmetros bioquímicos dos animais em relação à faixa de valores de referência ou valores normais estabelecida com os valores obtidos dos cães normais não infectados.

Tabela 2: Valores de referência dos parâmetros de bioquímica sérica de 45 cães normais.

Parâmetros	Valores de Referência*
Creatinina (mg/dL)	0,6 - 1,5
Uréia (mg/dL)	32,5 - 40,1
ALT/TGP (U/L)	31,2 - 63,2
AST/TGO (U/L)	26,1 - 48,1
Gama-GT	0,6 - 7,8
Fosfatase Alcalina (U/L)	11,8 - 51,0
Bilirrubina (mg/dL)	0,05 - 0,69
Proteína Total (g/dL)	6,4 - 8,9
Albumina (g/dL)	1,5 - 6,7
Globulina (g/dL)	0,7 - 6,3
Razão A/G	0,05 - 3,25

5.6.2 - Avaliação da resposta imune celular no contexto *ex vivo* e *in vitro*

Para avaliação da resposta imune celular foram traçados dois delineamentos experimentais, um no contexto *ex vivo* e o outro com foco no contexto *in vitro*.

No primeiro, direcionado para o contexto *ex vivo*, foram realizadas imunofenotipagens com marcadores de superfície celular do sangue periférico, utilizando a técnica de citometria de fluxo e protocolos desenvolvidos por Reis, 2001. No segundo, voltado para o contexto *in vitro*, foram realizadas imunofenotipagens utilizando marcadores de superfície celular para as subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) e marcadores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-4) em células do sangue periféricos submetidas à cultura, na ausência ou presença do antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (ASLi). Além disso foram avaliadas a atividade linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após 5 dias de estimulação com ASLi bem como o perfil imunofenotípico destas células.

5.6.3 - Obtenção de amostras de sangue periférico para avaliações no contexto *ex vivo* e *in vitro*

As amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20mL, através de punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos 5mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados à realização do leucograma e da imunofenotipagem *ex vivo* por citometria de fluxo.

Para realização dos testes de avaliação da resposta imune após estimulação *in vitro*, atividade linfoproliferativa e imunofenotipagem de cultura de 5 dias, 20mL de sangue foram coletados em seringa descartável estéril heparinizada de 20mL. Para as avaliações de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas foi utilizado sangue coletado em tubos estéreis contendo heparina sódica, em um volume final de sangue de 5mL. O sangue permaneceu em temperatura ambiente, por até 3 horas, até o momento do uso.

5.6.4 - Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto *ex vivo*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 3, 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 3), foram adicionados 30µL de sangue total coletado como descrito no item (5.6.3). 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 Lising 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 ressuspensionado 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 (20 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 3: 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)	RPE	Camundongo	CA17.2A12	Linfócitos T maduros
Anti Dog-CD5 (1:200)	RPE	Rato	YKIX322.3	Linfócitos T
Anti Dog-CD4 (1:800)	FITC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti Dog-CD8 (1:200)	FITC	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD21 (1:200)	RPE	Camundongo	CA2.1D6	Linfócitos B
Anti-CD16 humano (puro)	RPE-Cy5	Camundongo	3G8	Células NK
Anti-CD14 (1:320)	RPE-Cy5	Camundongo	TÜK4	Monócitos

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

5.6.5 - Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo no contexto *ex vivo*

5.6.5.1 - Avaliação em linfócitos e monócitos

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 (CD21⁺), de células NK CD5⁻CD16⁺ e frequência (%) de monócitos CD14⁺.

A análise da frequência de linfócitos T (CD3⁺) 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 (tamanho) versus SSC (complexidade) (Figura 2A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}, o percentual de linfócitos T, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência CD3/FL2 versus FL4, como exemplificado na Figura 2B. Para análise da frequência de linfócitos B (CD21⁺), foi utilizada a mesma estratégia.

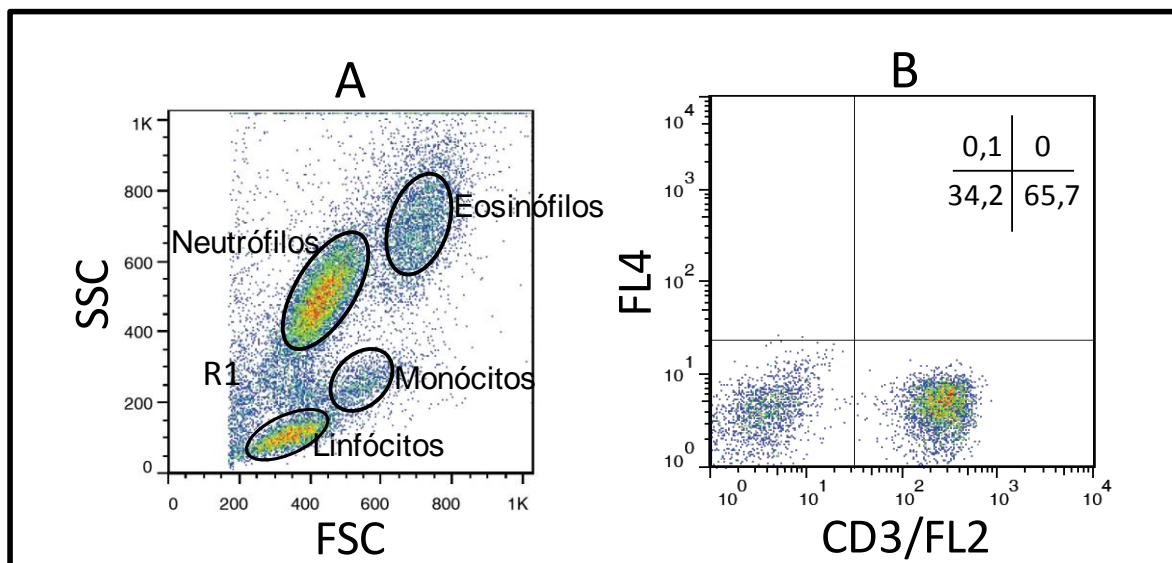


Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSCLowSSCLow. (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus FL4, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T CD3⁺. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

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 3A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSCLowSSCLow, o percentual de subpopulações T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas Figuras 3B e 3C.

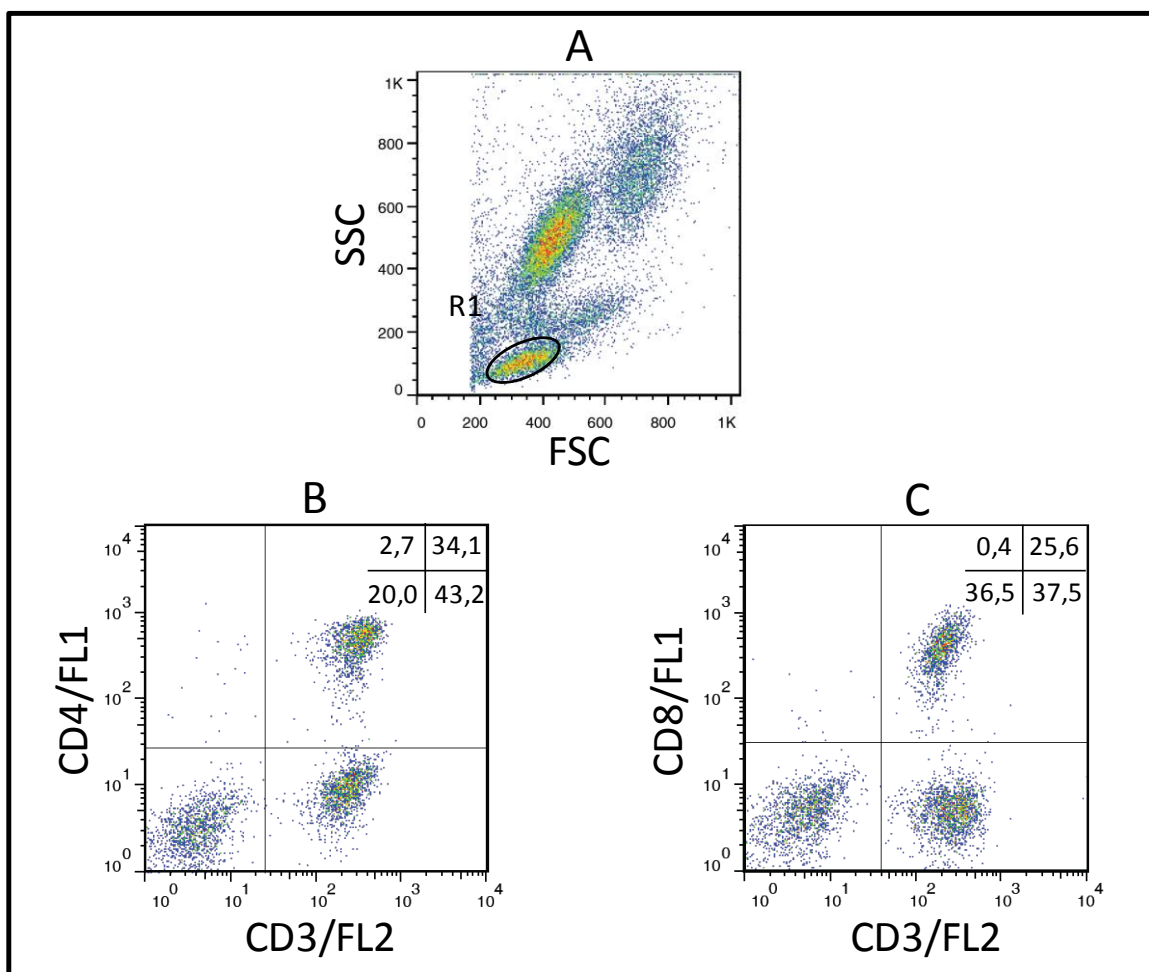


Figura 3: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e T $CD3^+CD8^+$, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSCLowSSCLow. (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus CD4/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$. (C) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus CD8/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD8^+$. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

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 4A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSCLowSSCLow, o percentual de células NK $CD5^-CD16^+$, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas Figuras 4B.

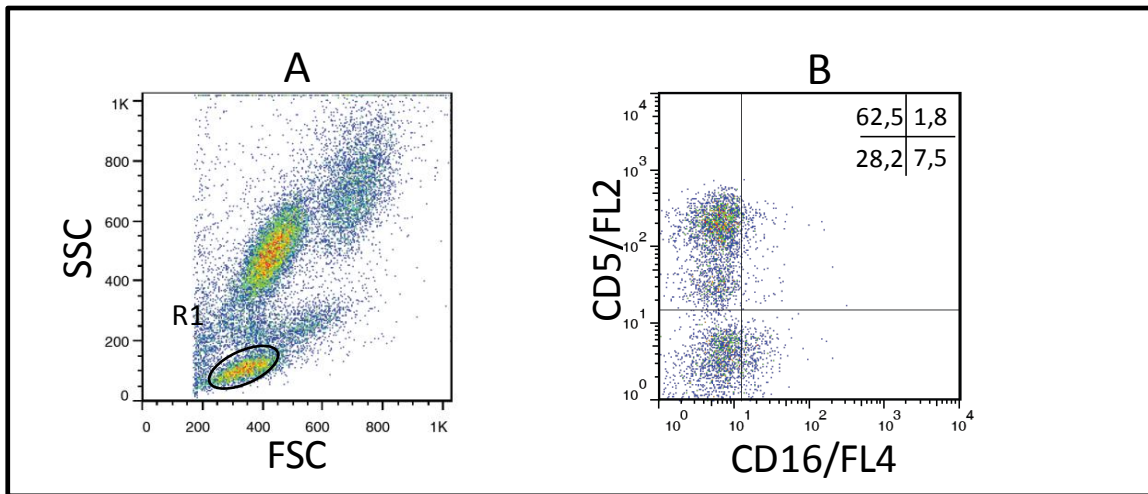


Figura 4: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de células NK CD5⁻CD16⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráficos de distribuição pontual CD5/FL2 versus CD16/FL4, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de células NK CD5⁻CD16⁺. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

A análise de monócitos CD14⁺ foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), 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 5).

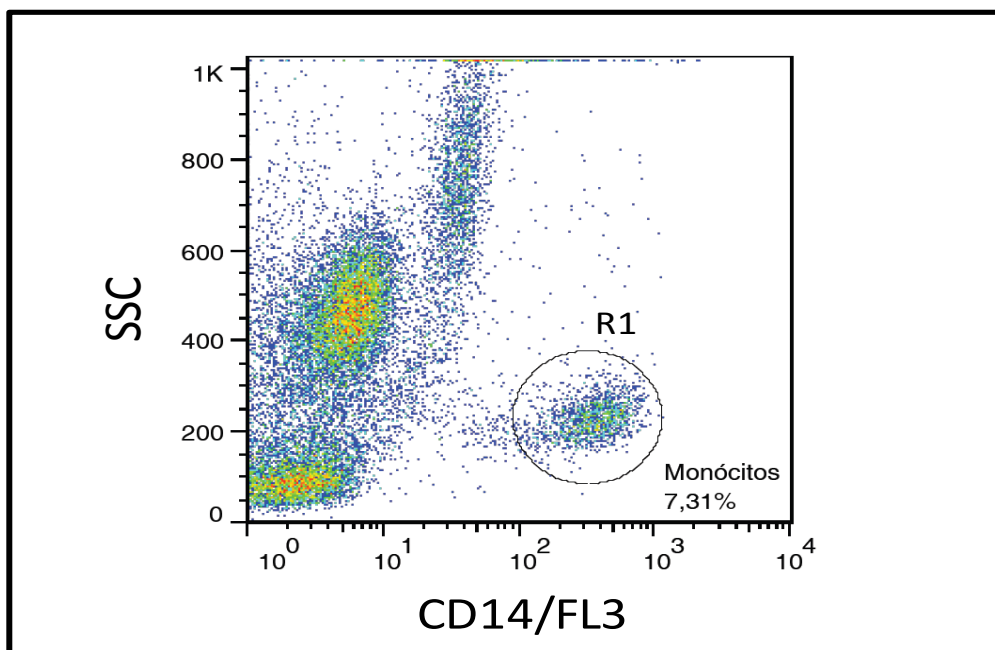


Figura 5: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos CD14⁺, no sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, indicando o posicionamento da população de monócitos. Este gráfico, CD14/FL3 versus SSC, Também é empregado para quantificar o percentual de monócitos.

5.6.6 - Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto *in vitro*

5.6.6.1 - 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 após cultura de 5 dias) foi utilizado antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) (MHOM/BR/1972/BH46). Após obtenção da massa de promastigotas (descrito item 5.1), 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. Subsequentemente o material foi 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.

5.6.7 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto *in vitro*

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 1 ou 2 mL em RPMI 1640 conforme a quantidade de sedimento obtido. 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.

5.6.7.1 - 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 duplicatas, 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 realizada em placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) cultivadas em quadruplicata. É importante ressaltar que estas avaliações foram realizadas para análise comparativa entre os períodos antes da imunoterapia (T0) e após 15, 30 e 90 dias do protocolo imunoterapêutico. 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 5 μ M (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 5 minutos a 4°C e a seguir as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI 1640 para plaqueamento.

Foram utilizados 650 μ L 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 μ L 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 μ L do estímulo ASLi diluídos em meio de RPMI 1640, na concentração final de 25 μ g/mL. Do agente mitogênico Con-A, foram adicionados 100 μ L da solução de uso diluída em RPMI 1640 nos respectivos orifícios da placa (concentração final de 10 μ 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 CO₂.

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 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 μ L de PBS 1X/pH 7,2 gelado. Posteriormente foi adicionado 100 μ L 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 50µL de PBS 1X/pH 7,2 sob agitação em vórtex e as células foram distribuídas em 2 tubos de poliestireno contendo 30µL de anticorpos monoclonais anti-CD4 (diluição 1:400) e anti-CD8 (diluição 1:100) conforme Tabela 4. 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 200µL/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 4: Pannel 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).

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

Após aquisição dos dados, 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, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 6A). Em seguida, os eventos selecionados nesta região foram representados em gráficos de distribuição pontual construídos com combinações de diferentes fluorescências, no exemplo temos CFSE/FL1 versus CD4/FL4 (Figura 6B). Um gráfico do tipo histograma foi feito para avaliação do percentual de células divididas por diluição do CFSE (eixo das abscissas). Esses gráficos devem ser lidos da direita para a esquerda, sendo que o primeiro pico corresponde as células que não sofreram divisão e os demais picos, conseqüentemente, correspondem as células que proliferaram (Figura 6C). Para essa análise utilizaremos a plataforma de proliferação do programa FlowJo[®], a qual

possui uma ferramenta (reta vertical) que deve ser arrastada para a posição ótima do pico correspondente as células que não se dividiram visualizado no gráfico do tipo histograma. A partir daí, o programa calcula o percentual de proliferação/divisão definindo, nos histogramas, um pico vermelho para a população não dividida e um número variável de picos em cor lilás correspondendo a cada ciclo de divisão celular (Figura 6C). É importante ressaltar que 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.

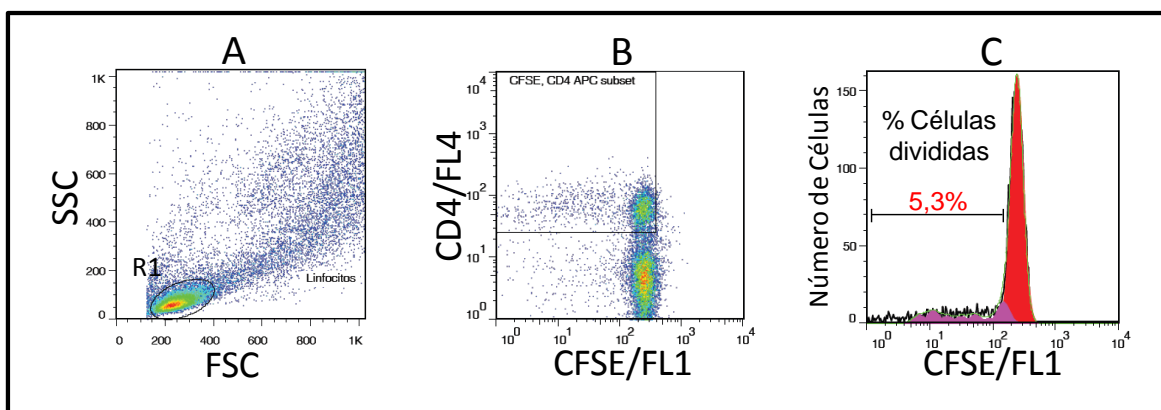


Figura 6: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺ na cultura de CMSP em cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}. (B) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL4 versus CFSE/FL1 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺ proliferadas em cultura estimulada com ASLi (C) Gráfico de histograma CFSE/FL1 versus número de células, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺ proliferados em cultura estimulada com ASLi utilizando a ferramenta de proliferação do programa FlowJo. No histograma está indicado exemplo representativo da frequência (%) correspondentes ao percentual de células que sofreram divisão.

5.6.8 - Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho encontram-se descritos na Tabela 5. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL de ASLi, 750 μL de RPMI e 1,0mL de sangue total em heparina) e tubo identificado como 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 50 μL de PMA (25ng/mL) e 2 μL de ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente o restante dos tubos foi retirado da estufa e adicionados 20 μL de brefeldina A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 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 200 μL ácido etilenodiamino tetracético - EDTA (Sigma), concentração final de 2mM, e incubadas por 10 minutos à TA. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6,0mL 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 2,0mL (sobrenadante e pellet) sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Ao abrigo da luz, foi retirado 500 μL do pellet e transferido para outros tubos de poliestireno, contendo os anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície CD4⁺ (diluição 1:400) e CD8⁺ (diluição 1:50). 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 500 μL 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 ressuspendido 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 isso, 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 5). 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 pelo menos 30.000 eventos/tubo.

Tabela 5: 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).

5.6.8.1 - Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando citocinas intracitoplasmáticas (INF- γ , IL-4) 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 7A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}, foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4/FL1 ou CD8/FL1 versus IFN- γ / FL2 ou IL-4/FL2, para determinar o percentual de células IFN- γ ⁺ e IL-4⁺ dentro da população de linfócitos previamente selecionada em R1. Como exemplo, abaixo, está demonstrada a sequência utilizada para análise em linfócitos T CD4⁺INF- γ ⁺ e T CD4⁺IL-4⁺ em cultura estimulada com ASLi (Figura 7B e 7C); para análise de linfócitos T CD8⁺ foi empregada a mesma estratégia.

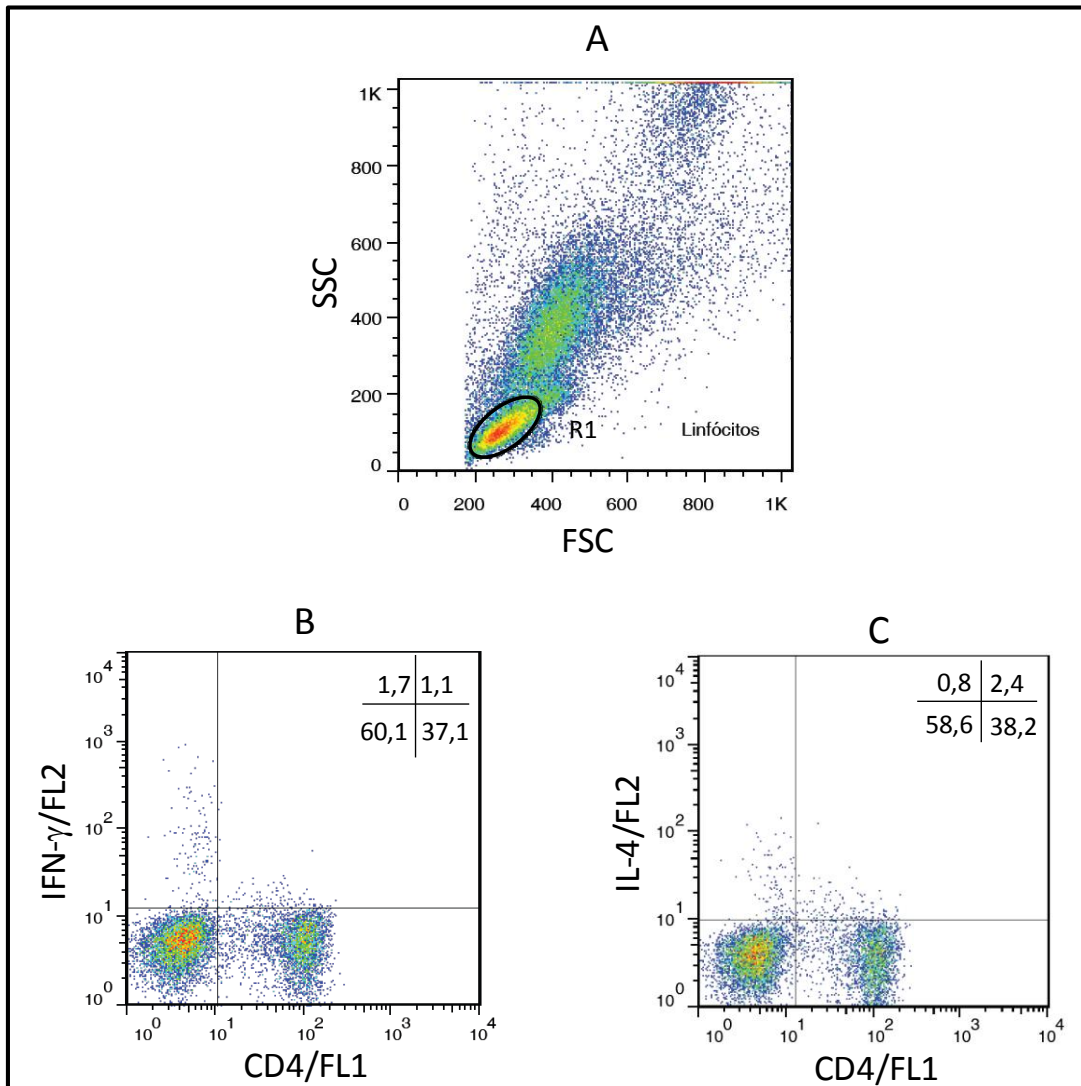


Figura 7: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-4⁺ na cultura de sangue total em cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPPL e cães controle submetidos ao tratamento com MPL apenas. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low} (B) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL1 versus IFN- γ /FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em cultura estimulada com ASLi (C) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4/FL1 versus IL-4/FL2, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ em cultura estimulada com ASLi. Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

5.6.9 - Quantificação de TNF- α e IL-10 por ELISA

A determinação dos níveis de TNF- α e IL-10 foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se sobrenadante de culturas estimuladas com ASLi. Foram utilizados anticorpos e proteínas recombinantes adquiridos da empresa R&D Systems (Minneapolis, USA). A cada poço da placa de 96 orifícios (COSTAR[®], USA) foram adicionados 25 μ L de anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada, diluído em

PBS estéril. As placas foram cobertas e incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram lavados por inversão e 4 sucessivas lavagens com 100µL da solução de PBS-Tween 20. A seguir, as placas foram bloqueadas com 75µL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1% e 0,05% de azida sódica (NaN₃), durante uma hora a TA, e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras do sobrenadante de cultura foram aplicadas em um volume de 25µL em cada poço da placa. Paralelamente, a citocina recombinante (TNF-α e IL-10) foi diluída em diferentes concentrações para estabelecimento de uma curva padrão, sendo a diluição realizada em solução PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). As placas foram vagarosamente homogeneizadas por um minuto e, em seguida, cobertas e incubadas por uma hora e meia a TA. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com 100µL de PBS-Tween 20. Em seguida, foi adicionado 25µL do anticorpo biotilado diluído apropriadamente em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃), em cada poço da placa. As placas foram mais uma vez mantidas ao abrigo da luz e incubadas a TA, por uma hora e meia seguido de uma lavagem com PBS-Tween 20. Então, após remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada poço 25µL de estreptoavidina (R&D Systms, Inc., Minneapolis, USA., DY998) diluída em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃). As placas foram mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a TA por vinte minutos. Após incubação, foram novamente lavadas e, em cada poço, foi adicionado 25µL da solução de substrato (mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina - TMB). Mais uma vez as placas foram incubadas a TA e ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 25µL por poço da solução de parada (H₂SO₄ 1M). A densidade óptica foi determinada usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL-800) no comprimento de onda de 450 nm sendo a concentração de citocinas determinada através de interpolação na curva padrão.

5.7 - Punções aspirativas de medula óssea

A punção de medula óssea foi realizada na região do esterno utilizando agulha 18G acoplada em uma seringa de 20mL. De cada animal foi aspirada uma amostra de cerca de 1,0mL de conteúdo de medula óssea, conforme descrito no item 5.3, e foi imediatamente transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado de 2mL, congelado e mantido a temperatura de -80°C para posterior análise por PCR em tempo real. Este procedimento foi realizado nos tempos antes da imunoterapia (T0) e após o término do tratamento, T90.

Antes do tratamento, uma alíquota de 0,25mL do aspirado foi semeada em meio de cultura NNN/LIT para isolamento do parasito.

5.8 - Biópsia de pele

Ainda sob o efeito da anestesia geral, a biópsia de pele dos cães foi realizada na região média da face interna da pina direita. O fragmento foi retirado com o auxílio de “punch” para biópsia estéril, de cinco milímetros de diâmetro (Punch para Biópsia®, Kolplast LTDA, Brasil), e armazenados imediatamente em recipiente contendo nitrogênio líquido para posterior análise da carga parasitária. Este material foi coletado antes de iniciar a imunoterapia (T0) e no momento da necropsia dos animais (T90).

5.9 - Punções aspirativas de baço guiadas por ultrassom e avaliação de esplenomegalia

Após a obtenção de estado de anestesia geral, com o animal em decúbito lateral direito, foi realizada tricotomia e anti-sepsia com solução de álcool iodado 2% (Rialcool®, Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, Brasil) na região da projeção da última costela do lado esquerdo. O baço foi localizado por ultrassom (SonoAce Pico, Samsung Medison Inc., Japão) e a seguir introduzida agulha de 18G acoplada à seringa de 10mL, por cerca de 1-3cm (na dependência do tamanho do animal), em ângulo de 45°. Após estes procedimentos preliminares foi realizada, então, leve pressão negativa no êmbolo da seringa até a obtenção da amostra de cerca de 1,0mL de conteúdo do órgão. Parte do material foi imediatamente transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado de 1,5mL, colocado em recipiente contendo nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a -80°C. Este procedimento foi realizado antes (T0) e 90 dias após a realização da imunoterapia.

Além disso, a análise de ultrassom do baço foi utilizada afim de se avaliar possíveis alterações desse órgão sugestivas de esplenomegalia. Para isso, antes da coleta do material de punção o baço foi fotografado através do equipamento (SonoAce Pico, Samsung Medison Inc., Japão) e determinado alterações presença ou ausência de esplenomegalia e suas possíveis gradações caracterizando os animais em: 1) baço normal; 2) esplenomegalia leve; 3) esplenomegalia moderada; 4) esplenomegalia importante. Os animais foram

avaliados no tempo antes da imunoterapia (T0) e após 90 dias da imunoterapia (T90) sendo gráficos de análise qualitativa construídos a partir dos resultados obtidos.

5.10 - Avaliação clínica e construção do score clínico dos animais

A avaliação clínica dos animais foi realizada antes da primeira dose de imunoterápico (tempo zero = T0) e nos tempos 15, 30 e 90 dias após as intervenções imunoterapêuticas, sendo que todos os animais foram submetidos ao exame físico e avaliações clínico/laboratoriais.

Os cães foram diariamente observados e submetidos a exame físico antes, durante e após os protocolos de imunoterapia. Quando foram identificadas alterações no exame físico, estas foram anotadas no prontuário (ANEXO 4) e documentadas por meio de fotografia.

As análises das alterações encontradas no exame físico foram tabuladas baseadas nos critérios de classificação de cada alteração clínica observada. Estas alterações foram pontuadas de acordo com a intensidade observada. Por exemplo, em relação à musculatura temporal, o animal que não apresentava alteração desse parâmetro recebia pontuação no valor de zero (0); para animais que apresentavam atrofia leve, era dada pontuação um (1); para animais que apresentavam atrofia moderada, era dada pontuação dois (2); para animais que apresentavam atrofia severa, era dada pontuação dois (3). Esta avaliação foi realizada para 22 parâmetros diferentes descritos na Ficha para Avaliação Clínica (ANEXO 4). Os cães receberam uma pontuação final de *score* que variou de 0, para os animais que apresentaram com ausência total de sinais e sintomas clínicos, a 64 que representa a somatória de todos os parâmetros avaliados na sua forma mais intensa. É importante ressaltar que todos os cães, independente do grupo, foram considerados sintomáticos apresentando sinais clínicos sugestivos de LVC. Para cada avaliação nos tempos 0 (T0) antes de tratar e 15, 30 e 90 dias após imunoterapia, foi construída uma ficha na qual o animal recebeu uma pontuação final que representava o somatório dos sinais/sintomas clínicos e suas intensidades. Os valores finais obtidos de cada animal foram planilhados e os resultados apresentados foram definidos de acordo com o percentual de redução de sinais/sintomas clínicos ou percentual de redução do *score* clínico de acordo com a evolução de cada animal.

5.11 - Análise Molecular para quantificação da carga parasitária no baço, pele e medula óssea pela técnica de PCR em tempo real

5.11.1 - Extração de DNA de tecidos

Para as extrações de DNA das amostras de aspirados de medula óssea, baço e pele o kit “DNeasy Blood & Tissue Kit[®]” (Quiagen Inc., EUA) foi empregado e o protocolo de extração seguiu as instruções do fabricante. Em 100µL do conteúdo aspirado da medula óssea foram adicionados 20µL de proteinase K (DNeasy Kit[®]), 100µL de PBS (pH 7,2) e 4µL de RNase (100mg/mL) em cada tubo, que foi incubado em temperatura ambiente por 2min. Posteriormente, foi adicionado 200µL de tampão AL (DNeasy Kit[®]) e as amostras submetidas a agitação com auxílio de aparelho vórtex (*Certomat MV*, B. Braun Biotech International, EUA) a 20.000g por 15s e colocados em incubação a 56°C por 10min. Após nova agitação com aparelho vórtex a 20.000g por 15s, foram acrescentados 200µL de etanol absoluto (Sigma, St. Louis, MO, USA) e as amostras foram novamente agitadas no aparelho vórtex. As amostras foram, então, transferidas individualmente para coluna DNeasy Mini Spin (DNeasy Kit[®]) acoplada a um tubo coletor (DNeasy Kit[®]). As colunas foram centrifugadas a 6.000g por 1min, o tubo coletor descartado, e logo transferidas para um novo tubo coletor. Foram adicionados 500µL do tampão AW1 (DNeasy Kit[®]), centrifugado a 6.000g por 1min e o tubo coletor descartado. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e em cada uma, foram adicionados 500µL do tampão AW2 (DNeasy Kit[®]), seguido de centrifugação a 20.000g por 3min para secagem da coluna. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado de 2mL, seguido de adição de 50µL de tampão AE (DNeasy Kit[®]) diretamente na membrana da coluna. As amostras foram incubadas a TA por 2min e centrifugadas a 6.000g por 1min. A coluna foi descartada e a concentração de DNA do produto obtido na extração determinada foi medida utilizando um espectrofotômetro (Nanovue, GE HealthCare, Inc., EUA). O produto de extração foi armazenado a -20°C para posterior análise.

No tecidos mais densos, pele de orelha e baço, ao fragmento ou quantidade de aspirado de cerca de 15-30mg de tecido em tubo de microcentrífuga autoclavado de 2mL, foram adicionados 180µL de tampão ATL (DNeasy Kit[®]), 20µL de proteinase K (DNeasy Kit[®]) e as amostras incubadas a 56°C por 12h até a completa lise dos tecidos. Os demais procedimentos para a extração, seguiram o já descrito anteriormente a partir do passo de

adição de RNase. O produto da extração destas amostras foi armazenado a -20°C para posterior análise.

5.11.2 - Clonagem dos produtos da amplificação do gene de *L. infantum*

Para a construção da curva padrão foram obtidos controles que possuíam um número conhecido de cópias do DNA de *L. infantum*. O produto de amplificação específico obtido foi clonado. A amplificação do DNA pela PCR convencional foi realizada de uma amostra de DNA de *L. infantum*, utilizando o par de iniciadores (direto: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', e reverso: 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3') que foram descritos por Bretagne *et al.*, 2001 e tem como alvo o gene da DNA polimerase de *L. infantum* (acesso no GenBank: AF009147) que é um gene de cópia única e amplificam um fragmento de 90pb.

5.11.3 - Reação em cadeia da Polimerase - PCR

Para a reação, foi utilizado DNA de *L. infantum* (1,0ng/μL). A reação constituiu de: tampão 1X, 1,5mM de MgCl₂, 2,0μM de dNTP, *primer* (5pmol), 0,76μL U Taq DNA polimerase (Fermentas -Sinapse[®]), 2,5μL de DNA e H₂O Milli Q totalizando um volume de 12,5μL por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. O equipamento utilizado para a realização de PCR foi o Verit Thermal Cycler 96 well (Applied Biosystems[®], Califórnia, USA). Parte do produto final da reação foi aplicada em um gel de agarose 1,5% (Invitrogen by Life Technologies, EUA), para comprovar o resultado da amplificação pela visualização da banda de interesse (90 pb).

5.11.4 - Clonagem

Após confirmação da presença e integridade da banda de interesse, e a ausência de outros amplicons, o produto da PCR foi inserido em um vetor plasmidial com objetivo de realizar a clonagem gênica usando o *kit pGEM*[®] T Vector Systems (Promega, EUA). O Mapa do vetor utilizado encontra-se na Figura 8.

Para cada reação de ligação, foi preparado um *mix* contendo 5µL de “2X Rapid Ligation Buffer”, 1µL de “p-GEM-T Easy Vector” e 1µL de “T4 DNA Ligase” e a razão molar foi 8 de inserto:1 de vetor. Após ser homogeneizado, o tubo foi mantido *overnight* 4°C por 16 horas para ocorrer à reação de ligação do inserto no vetor.

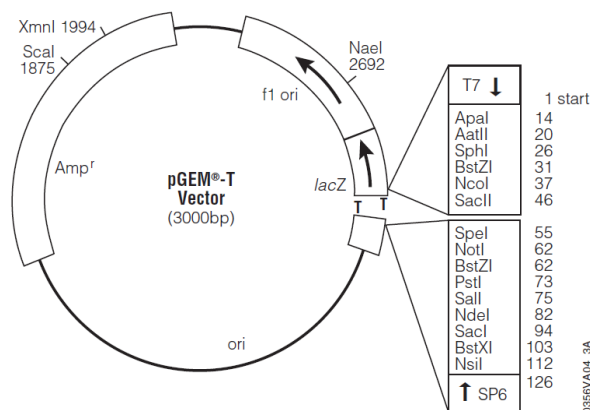


Figura 8: Mapa do vetor p-GEM®-T Vector. A sequência representada mostra o sitio de clonagem, região codificadora para o gene de resistência a ampicilina e β-galactosidase.

5.11.5 - Preparo de bactérias competentes, transformação bacteriana e purificação dos vetores por lise alcalina

As bactérias DH-5α foram inoculadas em 5mL de meio Luria Bertani (LB)1X (Bacto triptona 1%p/v; extrato de levedura 0,5%p/v; NaCl 171mM) e incubadas sob agitação 180rpm (*Shaker*, Innova 44), a 37°C por 16 horas. A cultura bacteriana foi transferida para 500mL de meio LB e novamente incubada a 37°C a 180rpm. O crescimento foi acompanhado até a cultura atingir uma A_{600} nm igual a 0,6, correspondendo ao crescimento equivalente à metade da fase logarítmica. As bactérias foram centrifugadas a 5000rpm durante 10 minutos a 4°C e o sedimento homogeneizado em 150mL de 75mM de CaCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,0. Subsequentemente, a suspensão bacteriana foi incubada em gelo por 20 minutos e centrifugada, como descrito previamente. O sedimento celular foi ressuspensão em 30mL da mesma solução, acrescida de 15% de glicerol e congelado rapidamente em mistura, gelo seco álcool e mantidas a -80°C, até o momento do uso.

A transformação bacteriana foi realizada utilizando 5µL da reação de ligação, adicionadas a 50µL de bactéria *Escherichia coli* DH5-α quimiocompetentes, descongeladas em gelo. Esta mistura foi homogeneizada levemente e mantida em gelo por 30 minutos, subsequentemente foi transferida para um banho aquecido a 42°C por 2

minutos, e em seguida, colocada em banho de gelo por 2 minutos, sendo imediatamente adicionado a ela 1µL de meio LB 1X sem antibióticos a cada tubo, os quais foram incubados por 1 hora no *Shaker* a 200-300rpm a 37°C. A cultura bacteriana foi sedimentada em microcentrifuga, a 1000rpm por 5 minutos. Em seguida, foi homogeneizada em 100µL de meio LB e um volume de 50µL foi semeada em placas de Petri contendo LB-ágar (LB acrescido de 1% de ágar) acrescido de ampicilina (100mg/mL), 0,4µL de *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) e 4µL de *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside* (X-Gal) 4%. Após este procedimento foi incubada em estufa B.O.D. (Estufa D.B.O., EletroLab, Brasil) a 37°C *overnight* (16 horas).

No dia seguinte, as colônias brancas, consideradas positivas, foram submetidas à triagem por PCR conforme especificado no item 5.7.4, para a confirmação do inserto. As colônias positivas para o inserto foram selecionadas para purificação do DNA plasmidial.

Para obtenção de DNA plasmidial em pequena escala foi utilizado o *kit* Wizard Miniprep (Promega,USA). O crescimento bacteriano foi feito em 10mL de meio LB com ampicilina a 37°C por 16 horas. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada por 5 minutos a 5000rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 250µL de solução de ressuspensão. Em seguida, foram adicionados 250µL de solução de lise e a mistura foi homogeneizada por inversão 4 vezes. Subsequentemente foram adicionados 10µL de solução de protease alcalina, a mistura foi invertida quatro vezes e incubada por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 350µL de solução de neutralização e a mistura foi homogeneizada por inversão, centrifugada a 13000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi removido e transferido para uma coluna contida em tubo coletor. Posteriormente, a coluna foi acoplada a um tubo de microcentrifuga e centrifugada a 13000rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente. Foram adicionados 750µL de solução de lavagem a coluna, centrifugada a 13000rpm por 1 minuto. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. O DNA plasmidial foi eluído em 50µL de água livre de nucleases e mantido a - 20°C, para posterior análise por qPCR em tempo real.

5.11.5 - Construção da curva-padrão para a PCR em tempo real

O produto da clonagem do gene de *L. infantum*, foi utilizado para a construção da curva-padrão. Os vetores contendo os insertos foram inicialmente dosados utilizando o

equipamento Nanovue (GE Healthcare Bio Sciences AB Sweden) a 260nm e 280nm. A partir da dosagem obtida, calculou-se a concentração de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de acordo com a fórmula:

$$\text{pmol}/\mu\text{L} = \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \frac{10^6 \text{pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{pmol}}{660 \text{pg}} \times \frac{1}{N}$$

Onde;

- N é o número de nucleotídeos (plasmídeo e inserto);
- 660pg é a massa molecular média de um ácido nucléico.

Levando-se em consideração o número de Avogadro: $1 \text{mol} = 6,02 \times 10^{23}$ moléculas, e sabendo-se que a concentração de cada solução de plasmídeo+inserto de interesse em $\text{pmol}/\mu\text{L}$, foi possível determinar o número de moléculas presentes por microlitro de cada amostra.

Depois de realizados estes cálculos, as amostras foram diluídas sucessivamente, sendo que aquelas contendo de 10^7 até 10^0 moléculas foram utilizadas para a construção das curvas-padrão. 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 Equipamentos Multiusuários do NUPEB/UFOP.

Os controles positivos de cada placa foram às amostras diluídas de plasmídeo contendo o inserto utilizado 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 ($5 \text{ng}/\mu\text{L}$); iniciadores ($5 \text{pmol}/\mu\text{L}$) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de $10 \mu\text{L}$ 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 dos plasmídeos com os insertos de interesse.

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' ACTCAGCACCCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). 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 da DNA polimerase utilizada neste estudo (Figura 9).

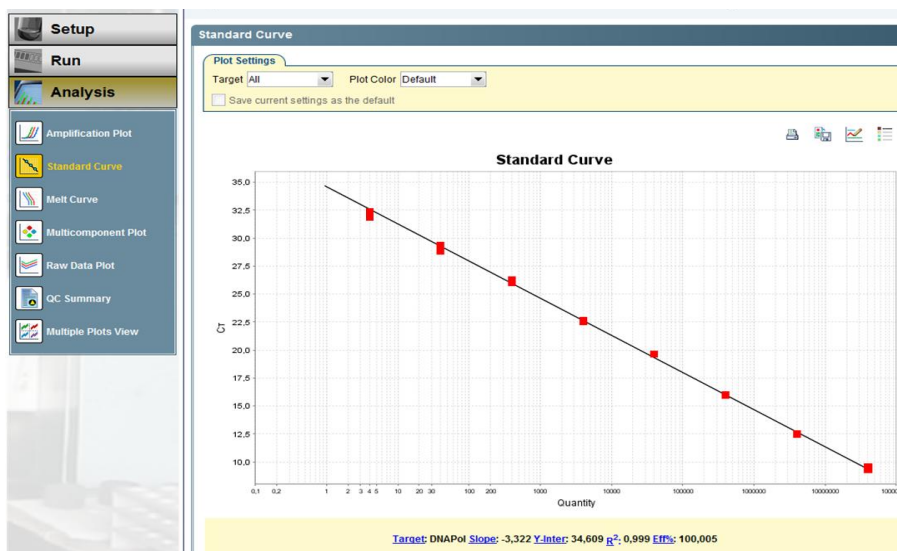


Figura 9: Exemplo da curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de *L. infantum*. Em X estão demonstrados os valores de *Log* da concentração de parasitos (10^7 a 10^0) e em Y os valores de *Ct* correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,32), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,999$) e a eficiência (100%).

Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido (baço ou pele) bem como, pelo número de amastigotas/mL (medula óssea).

5.12 - Xenodiagnóstico

Para realização do xenodiagnóstico foram utilizadas fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de uma colônia fechada, mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia do ICB estabelecida a partir de matrizes provenientes da cidade de Teresina, Estado do Piauí (Brasil). Os flebotomíneos empregados neste estudo foram criados em condições de temperatura (25°C-27°C) e umidade relativa (60%-70%) semi controladas, segundo a metodologia e condições descritas por Modi & Tesh (1983), com modificações.

Foram utilizadas 35-45 fêmeas e igual número de machos de *L. longipalpis*, com três dias de emergência, alimentados desde a eclosão com solução de sacarose 30% p/v. Estes flebotomíneos foram recolhidos das gaiolas em que são mantidos com um aspirador manual, “capturador de Castro”, e foram transferidos para um recipiente apropriado, denominado “Flebocontainer” (da Costa-Val et al., 2007). Após a anestesia dos animais, o Flebocontainer foi fixado, de modo que a parte da tela de nylon se mantenha diretamente em contato com pele da porção mediana da face interna da orelha direita dos cães por 30min, em ambiente escuro. Após a realização do repasto sanguíneo nos cães, os flebotomíneos foram imediatamente levados para condições semi controladas em estufa

B.O.D. (FANEM[®] modelo 347), a 25°C e umidade aproximada de 70%, por cinco dias. Neste período os insetos receberam, como fonte alimentar, solução de sacarose 30% (da Silva et al., 2010). O xenodiagnóstico foi realizado nos tempo zero (T0) e 90 dias após o tratamento.

5.13 - Necropsia e avaliação post mortem

Após as avaliações propostas no estudo, os animais foram submetidos ao processo de eutanásia, utilizando associação de 22 mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener®, Agener União, Brasil) e 2,0 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Calmium®, Agener União, Brasil) por via intramuscular, como protocolo de anestésico prévio, e aplicação, por via endovenosa lenta, de 20mg/kg de tiopental sódico (Thiopentax 1g, Cristália, Brasil) até obtenção do estado de anestesia geral. Imediatamente foi aplicado, por via endovenosa, uma dose letal de solução de cloreto de potássio saturada (KCl), para a obtenção de parada cardiorrespiratória. Após a confirmação do óbito, os animais foram submetidos a exame necroscópico, com avaliação macroscópica, seguida de retirada de fragmentos da pele da face interna das orelhas, pesagem e retirada de fragmentos do baço, fígado e linfonodos poplíteos para determinação da carga parasitária por qPCR e para análises histopatológicas e acondicionadas para posterior análise.

5.14 - Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com a distribuição dos dados utilizando o pacote estatístico GraphPad® InStat 5 (GraphPad Software Inc, EUA). De acordo com os resultados obtidos nas avaliações clínicolaboratoriais e parasitológicas foram avaliadas diferenças dentro de cada grupo e entre os diferentes grupos experimentais nos 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 *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 *Wilcoxon* foi utilizado na comparação entre amostras 2 a 2, para determinar as diferenças específicas do mesmo grupo entre o pré (T0) e o pós tratamento (T90). Já o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado na comparação entre os diferentes grupos em cada intervalo de tempo.

Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

6. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir, representam as avaliações nos grupos de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos, submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e seu respectivo grupo controle tratado apenas com o adjuvante MPL. Estes resultados foram obtidos de um grupo inicial de 05 cães machos e 05 fêmeas que foram alocados no grupo LBMPL e 02 cães machos e 04 fêmeas alocados no grupo MPL, todos sem raça definida e adultos (com idade estimada superior a 12 meses). No terceiro dia de início do tratamento com a vacina terapêutica LBMPL um cão (fêmea) veio a óbito por morte súbita. No grupo MPL, um cão (fêmea) morreu após a 1 série de tratamento devido a progressão da doença. Em nenhum dos casos foi realizada a necropsia dos animais, pois os óbitos ocorreram durante a noite ou na madrugada, o que inviabilizou a necropsia imediatamente após o óbito.

Neste grupo de cães todos os animais apresentaram RIFI positiva na diluição mínima de 1:40 e ELISA positiva na diluição 1:80. O diagnóstico sorológico foi realizado pelo CCZ de Governador Valadares de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde no seu Plano de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral no Brasil. Além disso, foi realizado o teste rápido imunocromatográfico DPP[®] (Bio-Manguinhos[®]) em todos os cães sendo esta reação positiva em todas as amostras de soros. Para reforçar os resultados sorológicos e confirmar a presença do parasito nos animais, estes foram submetidos ao isolamento do parasito em NNN/LIT e a reação de qPCR em tempo real em amostras obtidas por biopsias de punção de medula óssea.

Assim, foi observado que no grupo de cães que receberiam o adjuvante MPL como controle da imunoterapia, 4/6 (67%) animais tiveram amostras positivas para o isolamento do parasito em meio NNN/LIT, enquanto no grupo LBMPL 7/10 (70%) foram identificados com parasitos no isolamento da medula óssea em meio de cultura NNN/LIT. Em relação a qPCR em tempo real, todos os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram positividade para esta metodologia na medula óssea, sendo que as cargas parasitárias estão identificadas (amastigostas/mL) na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das avaliações sorológicas e parasitológicas dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* componentes dos grupos experimentais antes de iniciar a imunoterapia (T0).

	Testes						
	Grupo/Cães	RIFI (1:40)	ELISA (1:80)	DPP®	NNN/LIT	qPCR Medula Óssea Carga (/mL)	
M P L	C1	+	+	+	+	+	1246
	C2	+	+	+	-	+	7184
	C3*	+	+	+	+	+	72
	C4	+	+	+	-	+	1221
	C5	+	+	+	+	+	1377
	C6	+	+	+	+	+	4773
Total Cães (+)		6 / 6	6 / 6	6 / 6	4 / 6	6 / 6	
L B M P L	V1	+	+	+	-	+	100
	V2	+	+	+	+	+	8186
	V3*	+	+	+	+	+	226
	V4	+	+	+	+	+	12245
	V7	+	+	+	-	+	2618
	V10	+	+	+	+	+	7614
	V11	+	+	+	+	+	24389
	V12	+	+	+	-	+	11678
	V13	+	+	+	+	+	8564
	V14	+	+	+	+	+	6624
Total Cães (+)		10 / 10	10 / 10	10 / 10	7 / 10	10 / 10	

* C3 e V3 = animais que evoluíram ao óbito.

6.1 – Avaliação dos parâmetros laboratoriais

6.1.1 - Hemograma (Leucograma e Eritrograma)

A análise do hemograma (leucograma e eritrograma) é um dos principais parâmetros avaliados para prognóstico da gravidade da LV. Após tratamento bem sucedido, estes parâmetros tendem a normalidade gerando um prognóstico favorável para o indivíduo. Nesse sentido, com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros hematológicos dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos ao protocolo imunoterapêutico 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 1, item 5.6.1). Dessa maneira, foi possível avaliar antes (T0) e após a imunoterapia (15, 30 e 90 dias), 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).

Não foi possível observar alterações hematológicas em relação aos valores do leucograma (leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) nos animais antes e após a imunoterapia com a vacina LBMPL e no seu grupo controle tratado apenas com MPL, quando observada a faixa de valores de referência. Entretanto, foi observado no grupo controle submetido ao tratamento apenas com MPL, aumento nos valores absolutos de eosinófilos 90 dias pós tratamento (T90) quando comparado ao tempo antes da imunoterapia (T0). Além disso, foi observado redução dessa população celular no grupo LBMPL em T90 quando comparado a 15 dias após imunoterapia (T15) e em relação ao mesmo tempo (T90) no grupo MPL. Também foi observado aumento nas populações de linfócitos e monócitos 30 dias após a imunoterapia (T30) no grupo LBMPL quando comparado ao tempo antes do tratamento, T0 (Tabela 7).

Tabela 7: Leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle.

	Leucograma (/mm ³)	Valores de Referência	Tempos			
			T0	T15	T30	T90
MPL	Global de Leucócitos	7.408 - 14.440	9.680±2.275	10.540±2.161	10.925±2.497	10.800±2.636
	Neutrófilos Totais	3.839 - 9.379	5.353±906	5.696±1.537	5.936±1.372	7.474±2.886
	Eosinófilos	150 - 709,4	269±129	676±500	431±317	670±251 ^a
	Linfócitos	2.299 - 5.119	2.703±1.395	3.376±906	3.929±1.221	3.098±360
	Monócitos	147 - 601	251±149	345±257	280±148	397±211
LBMPL	Global de Leucócitos	7.408 - 14.440	8.750±2.162	9.725±2.116	10.900±3.095	9.886±2.060
	Neutrófilos Totais	3.839 - 9.379	5.585±1.814	5.111±878	4.681±679	5.696±1.523
	Eosinófilos	150 - 709,4	295±281	333±183	319±117	189±86 ^{b,*}
	Linfócitos	2.299 - 5.119	2.765±586	3.143±715	3.664±1.034 ^a	2.815±565
	Monócitos	147 - 601	200±107	369±110	513±184 ^a	364±113

Valores absolutos (média±desvio padrão) do leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. As diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas pelas letras **a** e **b** relacionadas aos tempos **T0** e **T15** respectivamente. O * representa diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos MPL e LBMPL no tempo **T90**.

Em relação ao eritrograma, foi observado que os animais do grupo controle MPL, antes do início da imunoterapia (T0), apresentavam valores de hemoglobina e plaquetas abaixo dos valores de normalidade (valores de referência) e que estes (hemoglobina e plaquetas) além dos valores de eritrócitos e hematócrito, permaneceram fora da faixa de

referência durante todo o acompanhamento experimental pós tratamento. Também, foi observada redução dos valores de plaquetas em T30 quando comparado a T15 (Tabela 8).

Quando avaliado o grupo de animais tratados com a vacina LBMPL, foi observado que estes cães apresentavam todos os parâmetros hematológicos relacionados a série vermelha (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito) e plaquetas fora da faixa de referência em T0 (antes de tratar) sendo que, após a imunoterapia, estes parâmetros retornaram para dentro da faixa de normalidade (Tabela 8). De forma interessante, foi observado nesse grupo de cães, aumento dos valores de eritrócitos em T30 e T90 quando comparado ao T0 e aumento de plaquetas em T15 quando comparado a T0. Ainda em relação à avaliação de plaquetas, foi observado aumento em T15 e T90 no grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL quando comparado ao grupo controle MPL (Tabela 8).

Tabela 8: Eritrograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle.

Eritrograma		Valores de Referência	Tempos			
			T0	T15	T30	T90
MPL	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5,42 - 8,38	6,0±1,6	5,3±0,8	5,3±1,0	5,3±0,8
	Hemoglobina (g/dL)	13,2 - 21,2	12,8±3,7	12,1±2,4	12,3±2,7	12,1±2,2
	Hematócrito (%)	33,7 - 57,3	35,2±9,1	31,5±5,1	31,6±5,6	31,8±4,5
	Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	171 - 384	135±13	109±27	153±14 ^b	113±46
LBMPL	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5,42 - 8,38	4,5±0,6	6,3±2,3	6,0±0,8 ^a	6,1±1,1 ^a
	Hemoglobina (g/dL)	13,2 - 21,2	11,0±2,2	15,2±5,9	13,3±2,8	14,6±2,4
	Hematócrito (%)	33,7 - 57,3	32,1±6,2	34,7±3,8	35,5±7,4	37,6±6
	Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	171 - 384	148±45	242±29 ^{a,*}	224±98	214±45 [*]

Valores absolutos (média±desvio padrão) do eritrograma e plaquetas de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. A cor vermelha representa valores que estão fora da faixa de referência. As diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas pelas letras **a** e **b** relacionadas aos tempos **T0** e **T15** respectivamente. Os * representam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos MPL e LBMPL nos tempos **T15** e **T90**.

6.1.2 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos

6.1.2.1 - Provas de função renal

A função renal é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da resposta individual ao tratamento na LV, bem como para a definição de prognóstico de evolução da doença. Além disso, a avaliação da função hepática e o proteinograma são parâmetros

laboratoriais fundamentais utilizados para verificar se há comprometimento hepático antes, durante e após o manejo terapêutico bem como para a avaliação da toxicidade dos protocolos.

Nesse sentido, com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros de bioquímica sérica dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos ao protocolo imunoterapêutico proposto neste estudo, foram avaliados 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses, afim de estabelecer valores de referência para função renal, hepática e proteinograma (Tabela 2, item 5.6.1). Dessa maneira, foi possível avaliar antes (T0) e após a imunoterapia (15, 30 e 90 dias), os parâmetros bioquímicos dos animais em comparação com a faixa de valores de referência ou valores normais estabelecida em nosso laboratório (Figura 10).

Em relação a avaliação da função renal, foi observado antes da imunoterapia (T0) que os cães do grupo MPL apresentavam valores de uréia muito próximos do limiar máximo de aceitação para este biomarcador e que estes valores se apresentavam acima da faixa de referência após a imunoterapia. Em relação ao grupo LBMPL, foi observado que os valores de uréia dos animais se encontravam acima dos valores de normalidade em T0 e que estes, após o tratamento, se tornaram normais. Além disso, foi observada redução dos valores de uréia em T15, T30 e T90 quando comparado ao tempo antes da imunoterapia com LBMPL (Figura 10).

Neste mesmo contexto, com relação à creatinina, não foi observada alteração dos seus valores séricos quando comparado aos valores de referência para os animais durante o estudo, entretanto os animais do grupo LBMPL apresentaram redução nos valores deste parâmetro bioquímico em T15, T30 e T90 quando comparado a T0 (Figura 10).

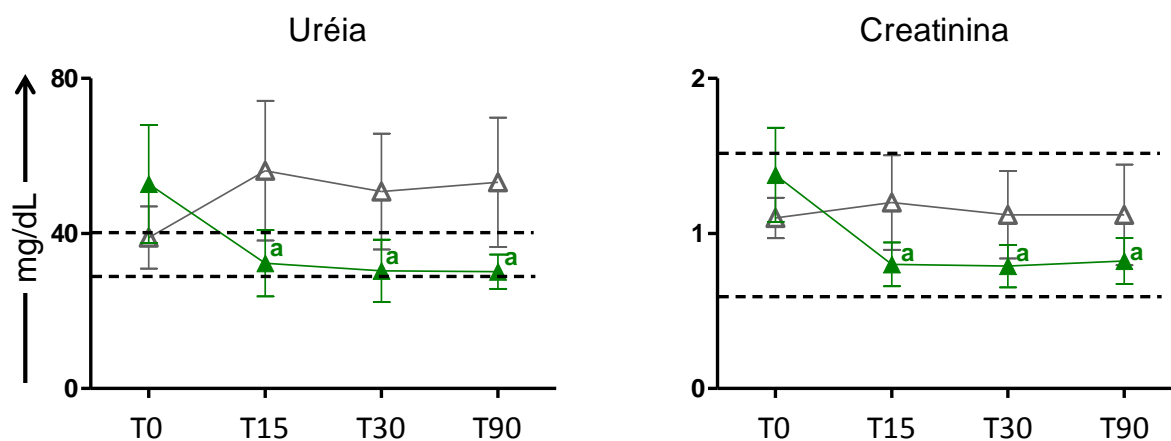


Figura 10: Avaliação da função renal através da dosagem de uréia e creatinina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15

dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das dosagens de uréia e creatinina (função renal). A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis. O grupo MPL está representado pelo triângulo de cor cinza (\triangle); o grupo LBMPL está representado pelo triângulo de cor verde (\blacktriangle). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pela letra **a**, relacionada ao tempo **T0**.

6.1.2.2 - Provas de função hepática

Em relação a avaliação da função hepática, não foi observada alteração em ALT ou TGP em relação aos valores de referência. Entretanto, no grupo LBMPL houve redução nos níveis séricos de ALT ou TGP em T15 e T30 quando comparado a T0. Na avaliação de AST ou TGO, foi observado que em ambos os grupos, MPL e LBMPL, apresentaram normalização nos níveis séricos deste parâmetro bioquímico após a imunoterapia. Além disso, foi observada redução nos níveis séricos de AST ou TGO em T30 no grupo MPL quando comparado a T0. Em relação a Gama-GT, foi observada normalização dos níveis séricos no grupo de cães submetidos ao tratamento com MPL com redução em T30 quando comparado a T0 (Figura 11).

Na avaliação dos níveis séricos de fosfatase alcalina, foi observada diminuição no grupo MPL em T30 quando comparado a T0 e aumento em T90 quando comparado a T15 e T30. Além disso, foi observado que este aumento (T90) estava acima dos valores de referência neste grupo. Quando avaliado o grupo de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL, foi observada diminuição dos níveis séricos de fosfatase alcalina em T15 e T30 quando comparado a T0. Além disso, foi observada redução dos níveis séricos deste parâmetro bioquímico ao final do acompanhamento (T90) no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL (Figura 11).

De forma interessante, os níveis séricos de bilirrubina total apresentaram-se acima dos valores de referência em T0 no grupo LBMPL e após a imunoterapia este parâmetro bioquímico se encontrou novamente com seus níveis normalizados. Além disso, foi observada redução nos níveis séricos de bilirrubina total em T15, T30 e T90 no grupo LBMPL quando comparado a T0 (Figura 11).

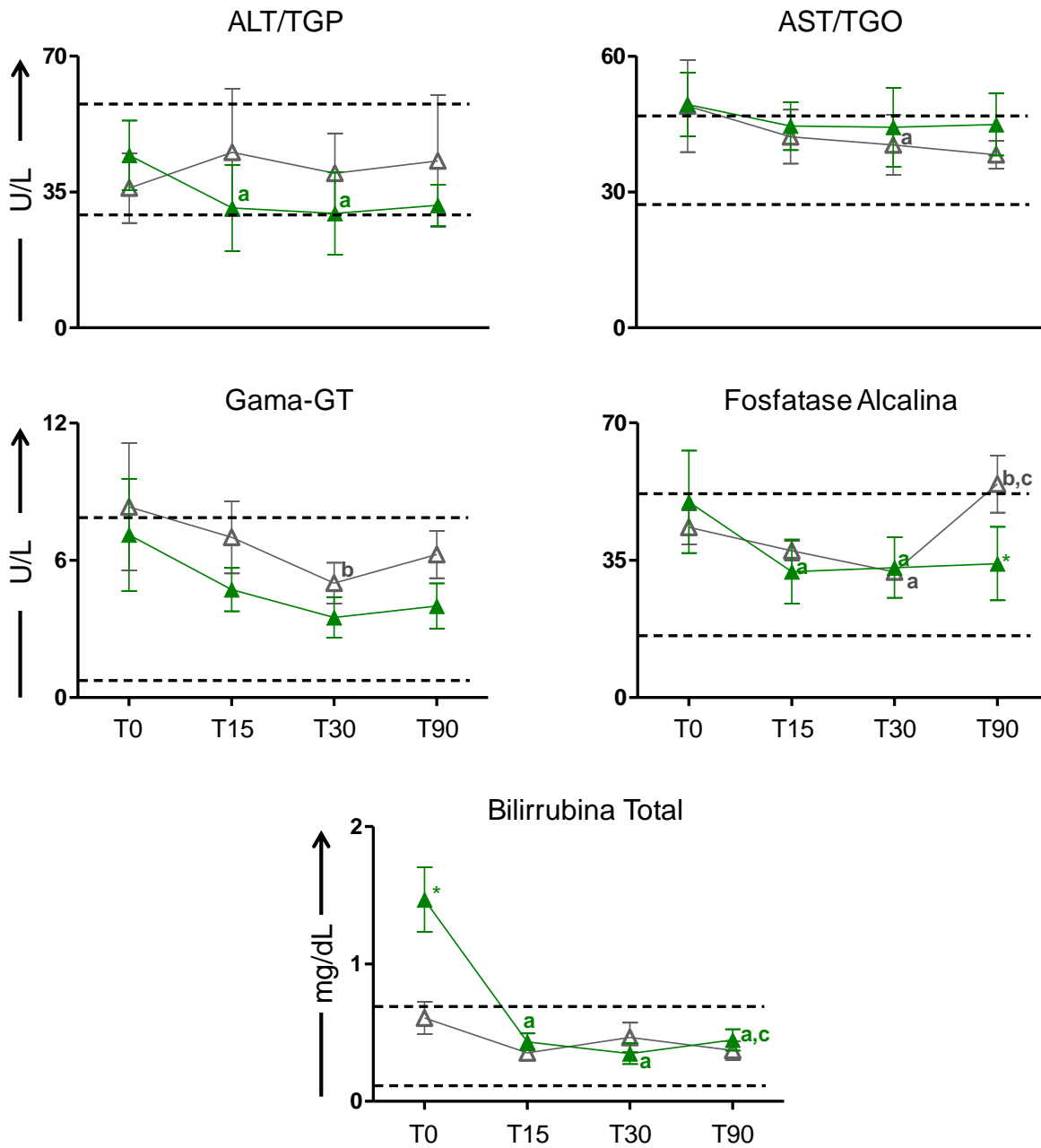


Figura 11: Avaliação da função hepática através da dosagem de TGP, TGO, Gama-GT, fosfatase alcalina e bilirrubina total em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das diferentes dosagens. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis. O grupo MPL está representado pelo triângulo de cor cinza (△); o grupo LBMPL está representado pelo triângulo de cor verde (▲). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b** e **c** relacionadas aos tempos **T0**, **T15** e **T30** respectivamente. Os * representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos MPL e LBMPL nos tempos **T0** e **T90**.

6.1.2.3 - Proteinograma

Na Figura 12, estão representados os resultados do proteinograma. Quando avaliado os níveis séricos de proteína total, foi observado no grupo MPL em T15, valores acima dos níveis normais. Além disso, esses valores estavam aumentados em T15 quando comparado a T0, T30 e T90. De forma inversa, foi observada normalização dos níveis séricos de proteína total no grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL quando comparado a avaliação antes do tratamento. Também foi observada diminuição desse parâmetro bioquímico em T15 quando comparado a T0 e T90 e quando comparado a T15 do grupo MPL (Figura 12).

Na avaliação de albumina sérica, foi observada redução dos níveis deste parâmetro bioquímico no grupo MPL em T90 quando comparado a T0, T15 e T30. Além disso, estes níveis séricos estavam abaixo dos valores normais de referência (T90). Na avaliação de globulinas séricas, foi observado aumento de seus níveis em T90 tanto no grupo de cães tratados com LBMPL quanto apenas com MPL. Já a avaliação da razão albumina/globulina (razão A/G), foi observado no grupo MPL, diminuição da razão em T90 quando comparado a T0, T15 e T30. Além disso, essa diminuição estava abaixo dos níveis normais neste grupo ao fim do acompanhamento (T90) (Figura 12).

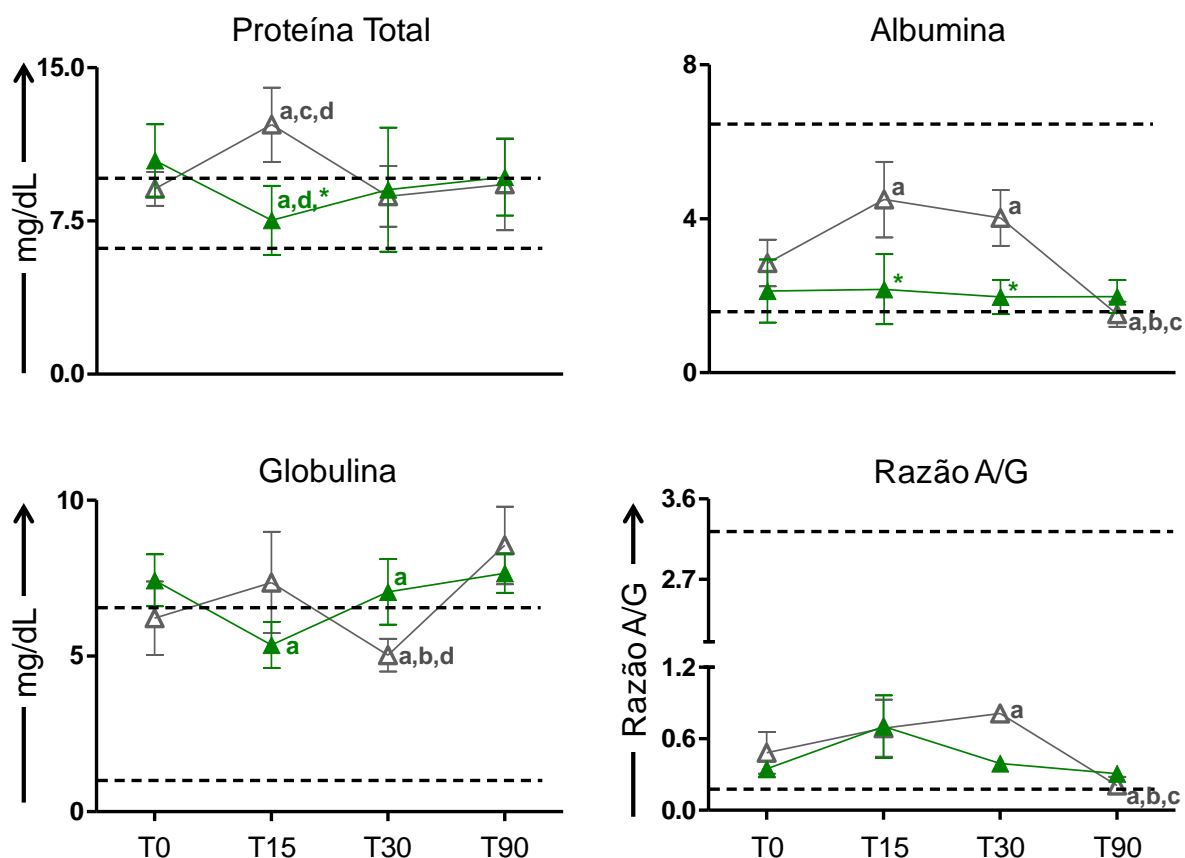


Figura 12: Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteína total, albumina, globulina e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das diferentes dosagens. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis. O grupo MPL está representado pelo triângulo de cor cinza (\triangle); o grupo LBMPL está representado pelo triângulo de cor verde (\blacktriangle). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d** relacionadas aos tempos **T0**, **T15**, **T30** e **T90** respectivamente. Os * representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos **MPL** e **LBMPL** nos tempos **T15** e **T30**.

6.1.3 - Avaliação da resposta imune no contexto *ex vivo*

6.1.3.1 - Perfil fenotípico de células T ($CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) e linfócitos B ($CD21^+$) circulantes do sangue periférico

O estudo do perfil celular dos grupos submetidos a imunoterapia 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 7). O perfil imunofenotípico destas células foi avaliado buscando-se ampliar o estudo de possíveis flutuações nas populações e subpopulações linfocitárias antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e no grupo controle MPL (Figura13). Para isto foi realizado um estudo detalhado do perfil imunofenotípico por citometria de fluxo, ajustando os dados com o hemograma afim de obter o valor absoluto de cada uma das subpopulações avaliadas. Neste contexto, foi observado aumento do valor médio absoluto de linfócitos T (LT) $CD3^+$ em T15, T30 e T90 no grupo LBMPL quando comparado ao tempo antes da imunoterapia, T0 (Figura13).

Quando avaliada as subpopulações de linfócitos T, foi observado no grupo MPL, aumento do valor médio absoluto dos LT $CD3^+CD4^+$ em T30 quando comparado ao T15. Além disso, também foi observado, aumento do valor médio absoluto da subpopulação de LT $CD3^+CD4^+$ em T30 no grupo de cães submetidos a imunoterapia com LBMPL em relação a T0 e T15 (Figura13). De forma semelhante, foi observado aumento do valor médio absoluto dos LT $CD3^+CD8^+$ no grupo LBMPL em T30 quando comparado a T0. Também foi observada redução do valor médio absoluto destas células em T15 no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL (Figura13).

De forma interessante, quando avaliada a população de linfócitos B ($CD21^+$), foi observada diminuição desta população celular em T90 no grupo LBMPL quando

comparado a T0. Além disso, essa redução também foi observada em relação ao grupo MPL neste mesmo tempo (T90).

Visando investigar o balanço no envolvimento da resposta imune de linfócitos T e linfócitos B antes e após a imunoterapia, foi calculada a razão entre os valores absolutos de linfócitos T e B do sangue periférico dos cães. Os resultados dessa razão estão representados na Figura 13. Foi observado aumento na razão LT/LB em T90 no grupo LBMPL em comparação ao T0 e quando comparado ao grupo MPL no último tempo de avaliação dos animais. Além disso foi avaliado o balanço do envolvimento da resposta imune adaptativa auxiliar e citotóxica antes e após a imunoterapia (Figura 13). Dessa maneira, a razão entre os valores absolutos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue periférico dos animais foi calculada, sendo observado aumento nesta razão em T30 no grupo MPL quando comparado a T0 e T15. Além disso, foi observada diminuição desta razão no grupo LBMPL em T90 quando comparado o tempo antes da imunoterapia (T0). De forma interessante, em T0 a razão LT $CD4^+/CD8^+$ estava maior no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL (Figura 13).

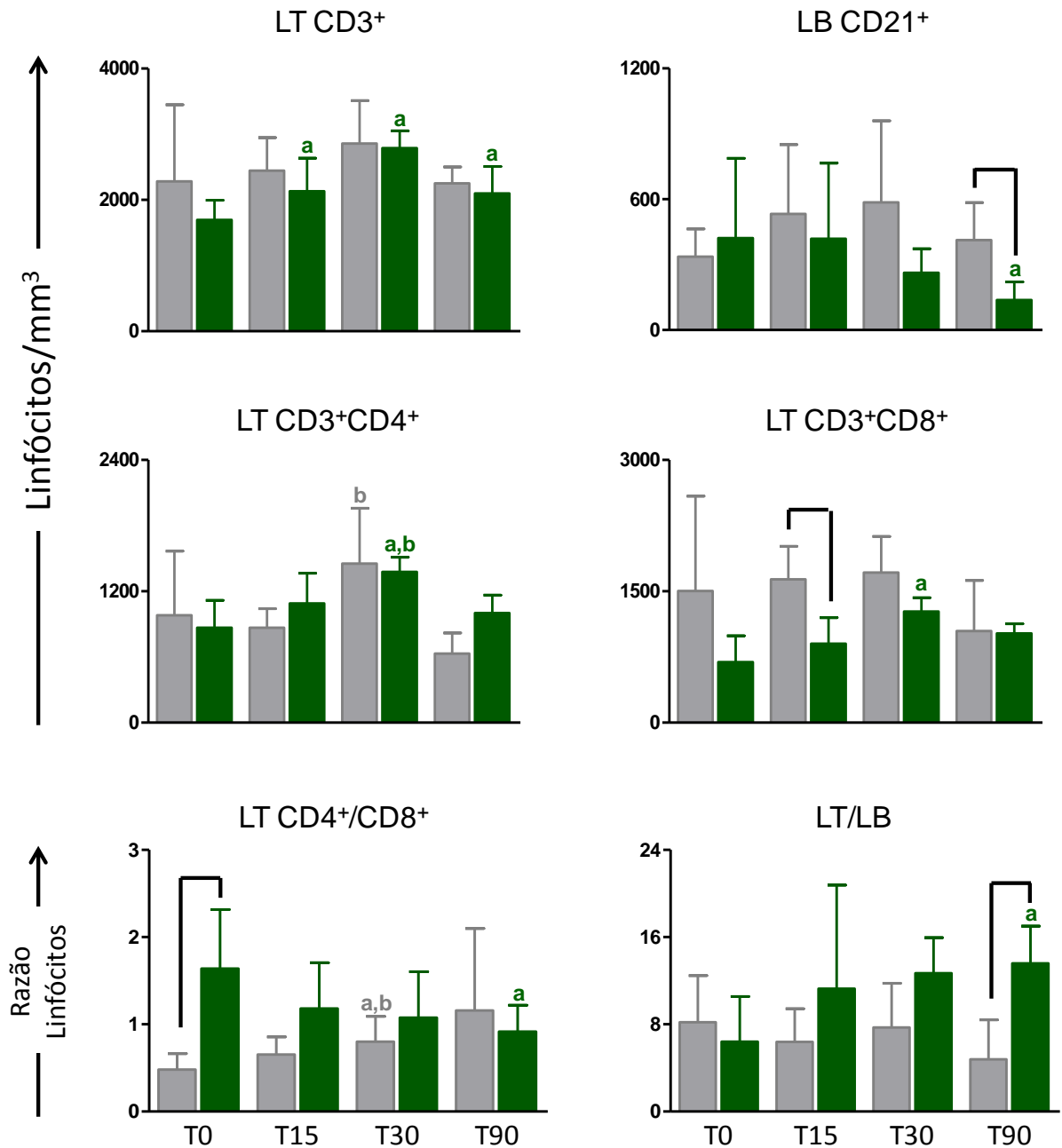


Figura 13: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão de linfócitos T (LT) CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B (CD21⁺). O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas pelas letras **a** e **b** relacionadas aos tempos **T0** e **T15** nos diferentes grupos respectivamente. As linhas conectoras representam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos MPL e LBMPL nos tempos **T0**, **T15** e **T90**.

6.1.3.2 - Perfil fenotípico de células NK (CD5⁻CD16⁺) e monócitos (CD14⁺) circulantes do sangue periférico

Em relação aos valores médios absolutos das células NK (CD5⁻CD16⁺), foi observado aumento no grupo MPL desta população celular em T30 quando comparado a T0, T15 e T90. Além disso, foi observado aumento dessa população celular no grupo LBMPL em T15, T30 e T90 quando comparado a T0 e em T15 em relação ao T90. De forma interessante, foi observado aumento das células NK (CD5⁻CD16⁺) no grupo LBMPL em T15 e T30 quando comparado ao grupo tratado apenas com MPL (Figura 14).

Já na avaliação de monócitos CD14⁺ foi observado aumento no grupo imunotratado com a vacina LBMPL em T30 e T90 quando comparado a T0 como observado na (Figura 14).

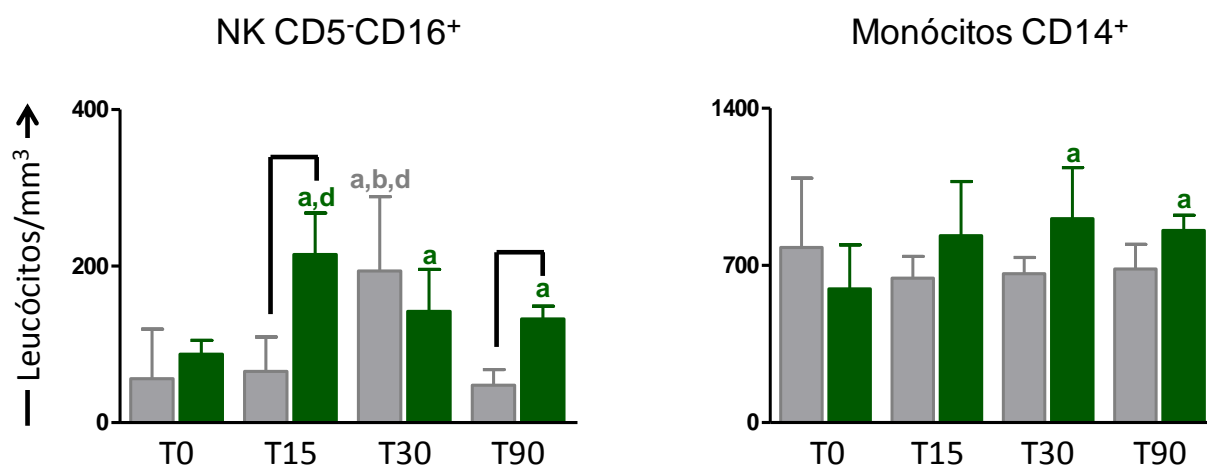


Figura 14: Perfil celular de células NK e monócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão de células NK (NK CD5⁻CD16⁺) e monócitos (CD14⁺). O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas pelas letras **a**, **b** e **d** relacionadas aos tempos **T0**, **T15** e **T90** nos diferentes grupos respectivamente. As **linhas conectoras** representam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos **MPL** e **LBMPL** nos tempos **T15** e **T90**.

6.1.4 - Avaliação da resposta imune no contexto *in vitro*

6.1.4.1 - Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) submetidos a estimulação antigênica com ASLi

Buscando-se avaliar a capacidade linfoproliferativa antígeno específica em cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e com adjuvante MPL apenas, foi

empregado o estímulo antigênico *in vitro* composto por antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) (Figura 15). Esta abordagem possibilitou a análise da indução de memória imunológica frente a antígenos relacionados ao agente etiológico da LV (ASLi). Em relação a linfoproliferação, foi observado aumento no grupo LBMPL em T90 quando comparado a T0 e em relação ao grupo MPL (Figura 15). Como controle positivo da reação, foi utilizado o estímulo inespecífico ConA para avaliação da viabilidade celular após 5 dias de estímulo e observamos valores médios de índice de proliferação de 10,0 (T0), 26,0 (T15), 17,1 (T30) e 18,4 (T90).

Uma segunda abordagem desta análise *in vitro* buscou avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos através do índice proliferação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) obtido pela razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) e as culturas controle não estimuladas (CC) (Figura 15). A avaliação do índice de proliferação de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos revelou aumento significativo ($P < 0,05$) em T15, T30 e T90 quando comparado a T0. Já a avaliação dos linfócitos T CD8⁺ demonstrou, de forma semelhante a subpopulação de LT CD4⁺, aumento no grupo LBMPL em T15, T30 e T90 quando comparado a T0. Além disso, foi observado aumento desta população celular em T15 no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL (Figura 15). Quando avaliada a subpopulação de LT CD8⁺, observamos aumento no grupo MPL em T15 em relação a T30. De forma interessante, em todos os tempos após a imunoterapia com a vacina LBMPL (T15, T30 e T90), observamos aumento da subpopulação de LT CD8⁺ antígeno-específica quando comparado a T0. Além disso, observou-se aumento desta subpopulação celular no grupo LBMPL em T30 quando comparado ao grupo MPL (Figura 15).

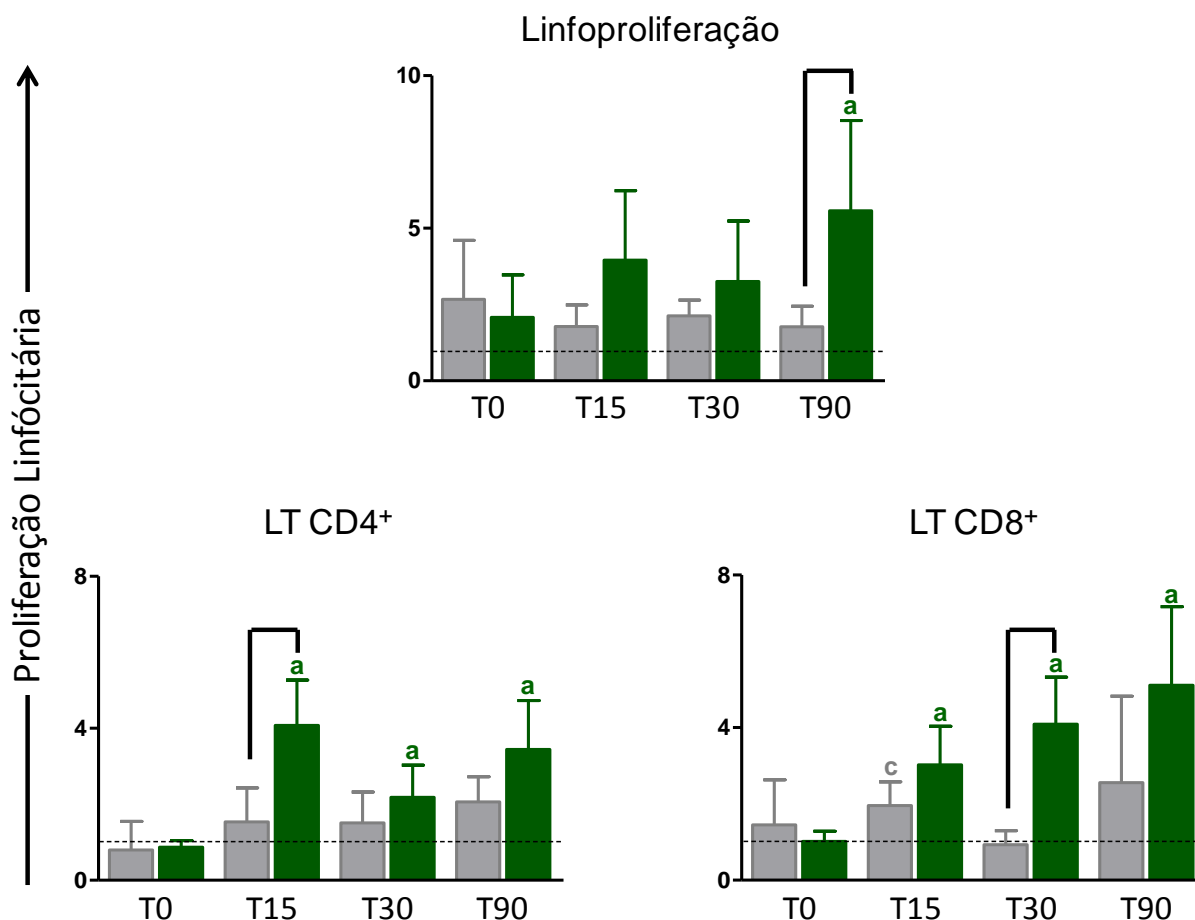


Figura 15: Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica (LT CD4⁺ e LT CD8⁺) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de proliferação e do índice de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (razão CE/CC). O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas pelas letras **a** e **c** relacionadas aos tempos **T0** e **T30** nos diferentes grupos respectivamente. As **linhas conectoras** representam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos **MPL** e **LBMPL** nos tempos **T15**, **T30** e **T90**.

6.1.4.2 - Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-4 por Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após estimulação antígeno-específica *in vitro*

Preconizado por diversos pesquisadores o IFN- γ é um importante biomarcador relacionado a resistência a infecção por *Leishmania*. Neste contexto buscamos avaliar a produção de IFN- γ após estímulo específico por *L. infantum*. Os resultados da avaliação de linfócitos T CD4⁺ e LT CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-4 após estímulo *in vitro* serão apresentados na forma de índices correspondentes a razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) e as culturas não estimuladas (CC) (CE/CC; Figura 16).

Na avaliação da subpopulação de linfócitos T CD4⁺, foi observado aumento no índice de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ no grupo LBMPL nos tempos T15, T30 e T90 quando comparado ao tempo antes da imunoterapia, T0 bem como quando comparado ao grupo MPL neste mesmo momento da avaliação (T90). Além disso, em T15 houve redução no índice de LT CD4⁺IFN- γ ⁺ em LBMPL quando comparado ao grupo MPL (Figura 16). De forma interessante, foi observado redução na população de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ no grupo LBMPL em T15, T30 e T90 quando comparado ao tempo antes da imunoterapia. Em relação ao grupo MPL, foi observado aumento desse índice em T90 quando comparado a T30. quando comparado ao T0. Além disso, foi observado redução no índice de LT CD4⁺IFN- γ ⁺ no grupo LBMPL em T15 e T90 quando comparado ao grupo MPL (Figura 16).

Na avaliação da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ foi observado aumento no índice de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ no grupo LBMPL em T15 quando comparado a T0 e T30. Além disso, observamos aumento deste índice no grupo LBMPL em T15 e T30 quando comparado ao grupo controle MPL. Quando avaliada a população de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺, foi observado diminuição no grupo MPL em T15 e T30 quando comparado a T0. Já no grupo LBMPL, foi observada redução deste índice em T90 quando comparado aos tempos T0, T15 e T30 (Figura 16). De forma interessante, observamos aumento de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺ no grupo LBMPL em T15 quando comparado ao grupo MPL e a diminuição em T90 deste índice no grupo LBMPL em relação aos cães do grupo MPL.

Na análise da razão entre os índices de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ foi observado aumento desta razão no grupo MPL em T15 quando comparado a T90. De forma interessante, observamos aumento considerável desta razão no grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL em todos os tempos após a imunoterapia quando comparado ao tempo antes do tratamento, T0. Além disso, observamos aumento desta razão (CD4⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺) no grupo LBMPL em T30 e T90 quando comparado ao grupo MPL (Figura 16).

Em relação a razão de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ foi observado aumento no grupo MPL em T90 quando comparado a T30. Já no grupo LBMPL, observamos aumento desta razão nos tempos 15 e 90 após a imunoterapia em relação a T0 e em relação ao grupo controle MPL nestes mesmos tempos de avaliação (T15 e T90) (Figura 16).

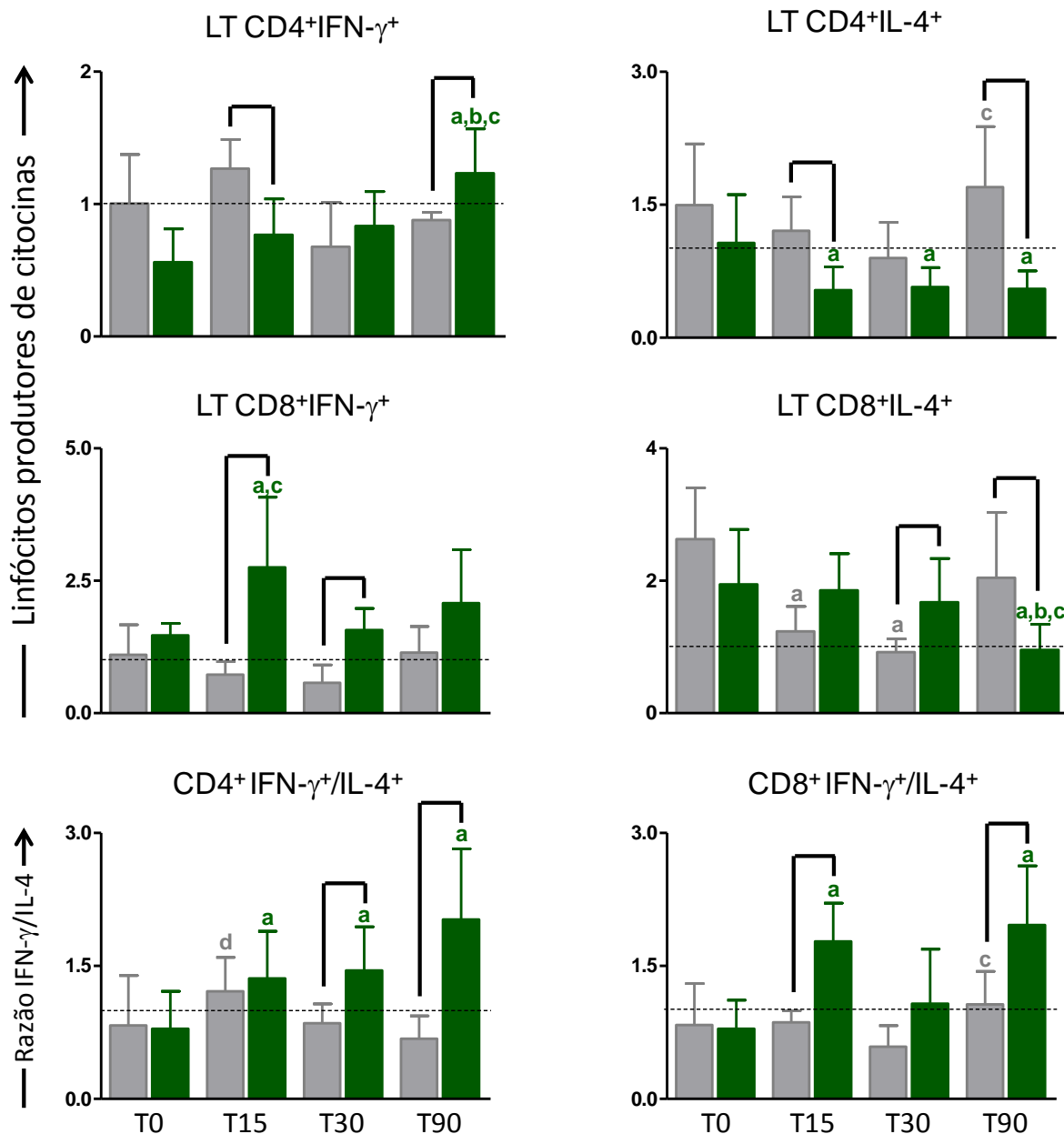


Figura 16: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. 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 e culturas controle não estimuladas (CE/CC) além dos valores médios e desvio padrão das razões entre os índices de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ /IL-4⁺ e LT CD8⁺ IFN- γ /IL-4⁺. O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). As diferenças significativas (P<0,05) estão representadas pelas letras a, b, c e d relacionadas aos tempos T0, T15, T30 e T90 nos diferentes grupos respectivamente. As linhas conectoras representam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos MPL e LBMPL nos tempos T15, T30 e T90.

6.1.4.3 - Produção de TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi

A avaliação do perfil de citocinas em CMSP podem sugerir padrões de resistência e/ou susceptibilidade em resposta ao tratamento na LV. Considerando as limitações para avaliar biomarcadores imunológicos no modelo cão e, no sentido de complementar o estudo de citocinas envolvidas na resposta imune por *Leishmania* antes e após a imunoterapia com a vacina LBMPL, foi avaliado a produção de TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi.

Em relação a TNF- α , foi observado aumento dessa citocina no grupo LBMPL em T15 e T30 quando comparado a T0. Além disso, observamos diminuição dessa citocina em T90 quando comparado ao tempo antes do tratamento (T0), T15 e T30 neste grupo (Figura 17). De forma interessante, foi observado aumento na produção desta citocina em CMSP de cães do grupo LBMPL em T0, T15 e T30 quando comparado ao grupo MPL. Em relação a citocina imunomodulatória IL-10, foi observado redução em T90 no grupo LBMPL quando comparado ao tempo antes de tratar, T0 e T15. Além disso, observamos que em T90 houve redução desta citocina no grupo LBMPL em relação ao grupo MPL (Figura 17).

Considerando a hipótese geral de que é mais relevante um direcionamento/restabelecimento na produção de citocinas Th1 na leishmaniose visceral, uma segunda abordagem da avaliação de citocinas buscou calcular a razão entre a citocina pró inflamatória TNF- α e IL-10. Nesse sentido, foi observado aumento na razão TNF- α /IL-10 no grupo LBMPL em T15 e T30 quando comparado ao tempo T0 e T90. De forma interessante, também foi observado aumento desta razão em T0, T15 e T30 no grupo LBMPL em relação aos cães do grupo MPL (Figura 17).

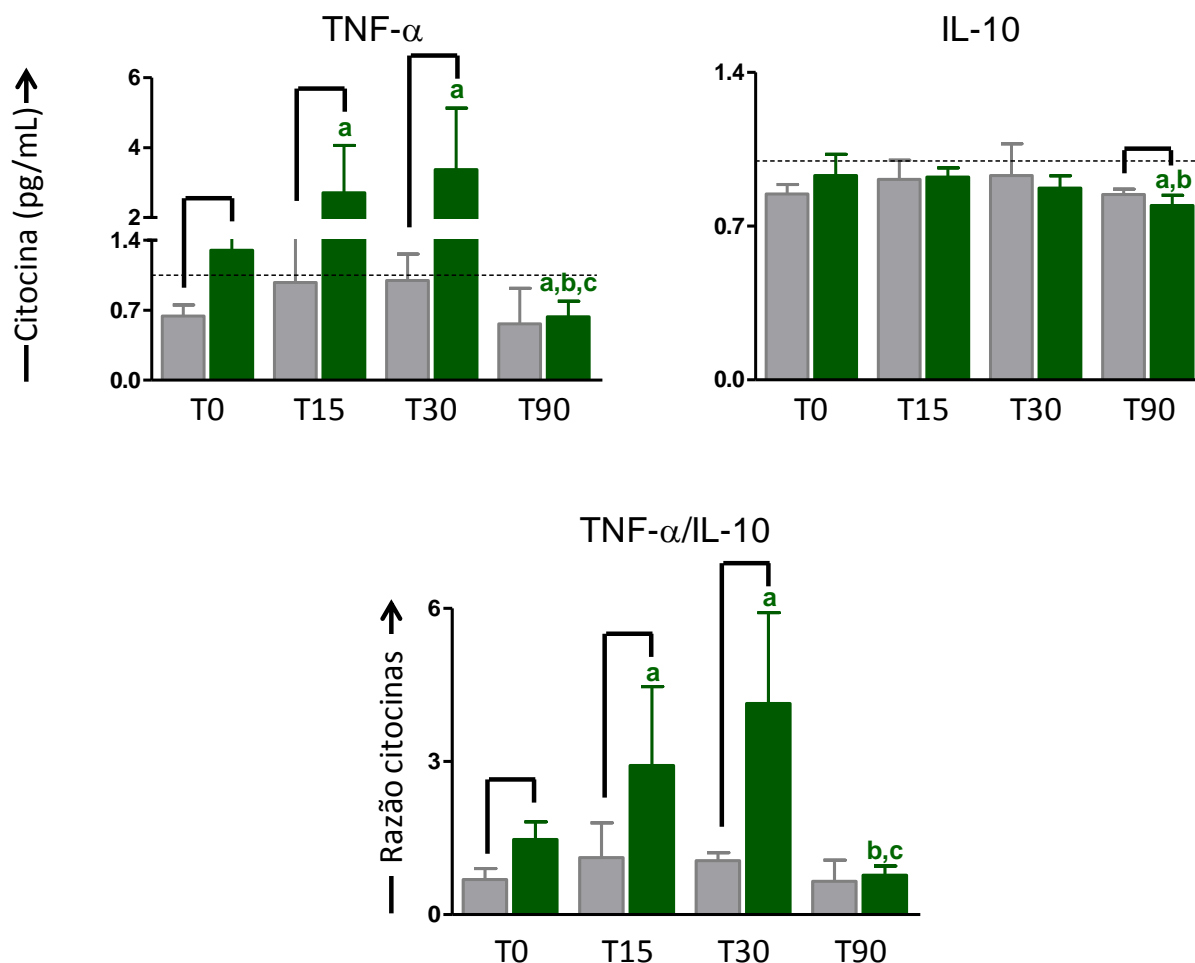


Figura 17: Produção de TNF- α e IL-10 em CMSP de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T15 = 15 dias pós imunoterapia; T30 = 30 dias pós imunoterapia; T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice das citocinas TNF- α e IL-10 (razão CE/CC). O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b** e **c** relacionadas aos tempos **T0**, **T15** e **T30** nos diferentes grupos respectivamente. As **linhas conectoras** representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos **MPL** e **LBMPL** nos tempos **T0**, **T15**, **T30** e **T90**.

6.2 – Avaliação clínica e da esplenomegalia por ultrassom

6.2.1 - Exame físico e score clínico

Todos os cães selecionados para este ensaio pré-clínico foram avaliados sistematicamente por um médico veterinário (Dr. Sydnei Magno da Silva) especialista em ultrassonografia e em clínica da leishmaniose visceral canina e com vasta experiência em tratamento experimental na LVC. O objetivo desta avaliação clínica veterinária foi monitorar os sinais e sintomas clínicos típicos da LVC antes e após intervenção com a

vacina terapêutica LBMPL, no sentido de dectar e documentar melhora ou piora do quadro clínico nos animais submetidos ao protocolo imunoterapêutico.

Assim, de uma forma geral, os animais do grupo que receberam apenas o adjuvante MPL apresentaram sinais clínicos mais exuberantes da LVC. Em contrapartida, os animais que receberam a imunoterapia com a vacina LBMPL apresentaram melhora gradual dos sinais/sintomas clínicos durante o tratamento. Esta melhora foi notada desde a primeira avaliação após a primeira série de imunoterapia, e tornou-se mais evidente nas avaliações pós protocolo terapêutico (T15, T30 e T90), e este quadro se manteve sem piora até o momento da eutanásia (150 dias de acompanhamento).

Na Figura 18 encontram-se registrados os principais sinais/sintomas clínicos dos cães antes (T0) e após (T90) a imunoterapia com a vacina LBMPL e com o adjuvante MPL ministrado isoladamente. Assim, é possível observar que em relação ao grupo MPL que os animais apresentaram aumento dos sinais/sintomas clínicos sugestivos de leishmaniose visceral canina ao final do acompanhamento da imunoterapia experimental (Figura 19A). As principais alterações observadas neste grupo de cães (MPL) ao fim do tratamento foram atrofia muscular 5/5 (100%), linfadenopatia 5/5 (100%), dermatites 5/5 (100%), onicogrifose 4/5 (80%), alopecia 4/5 (80%). Além disso, mais animais apresentaram alopecia, eritema na pele, conjuntivite, apatia, artrite e presença de nódulos (Figura 18A).

Por outro lado, em relação ao grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL, é possível observar uma grande redução nos sinais/sintomas clínicos sugestivos de LVC ao fim do acompanhamento da imunoterapia experimental (Figura 18B). Os sinais clínicos mais comuns apresentados por estes animais foram: linfadenopatia 7/9 (78%), alopecia 4/9 (44%), onicogrifose 3/9 (33%) e dermatite seborréica 2/9 (22%). Além disto, não foram observados nestes animais surgimento de nenhum sinal clínico após a imunoterapia (Figura 18B). Ao fim do estudo, nenhum cão deste grupo experimental demonstrava apatia, dermatite furfurácea, eritema na pele, perda de pelos, nódulos ou diarreia.

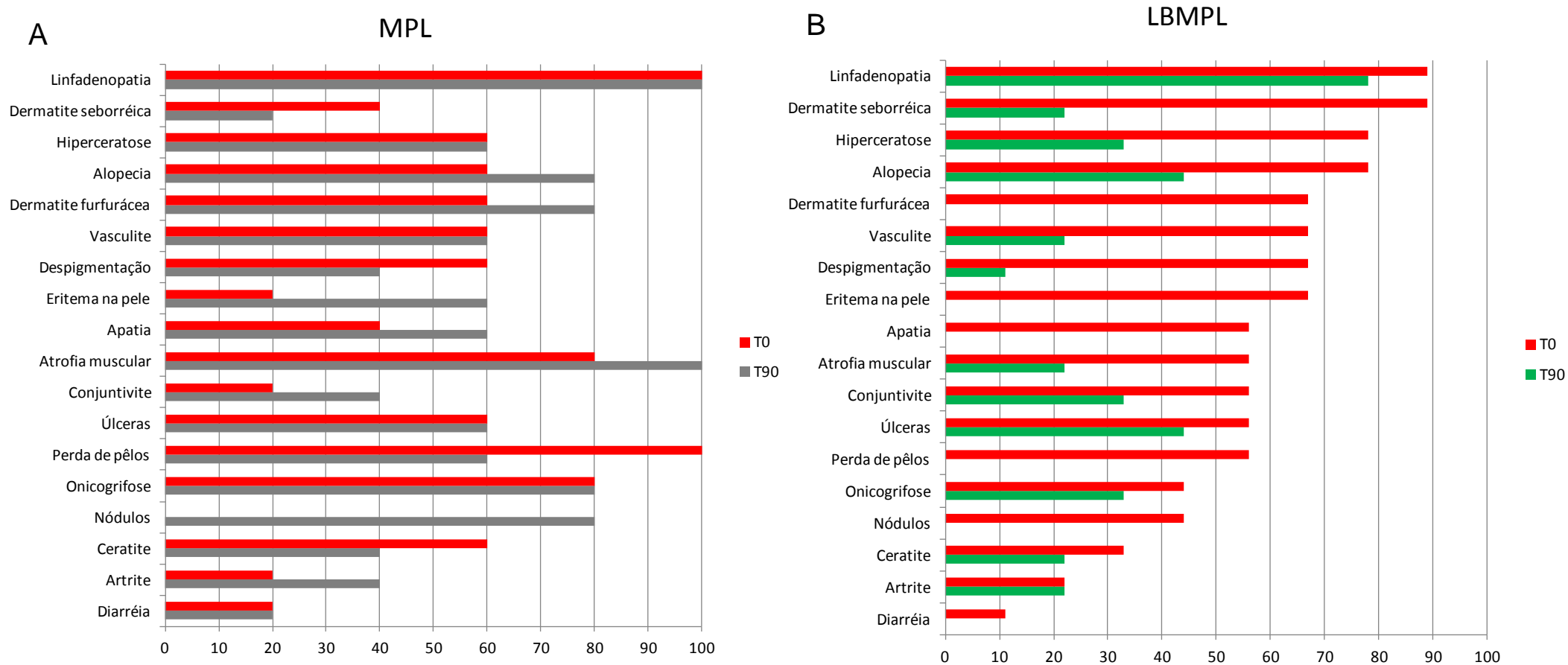


Figura 18: Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. (A) Gráfico representativo do percentual de sinais/sintomas clínicos, antes da imunoterapia (T0) e 90 dias após tratamento (T90). O grupo MPL está representado pelas barras na cor vermelha (■) referente ao T0 e na cor cinza (■) referente a T90. (B) Gráfico representativo do percentual de sinais/sintomas clínicos, antes da imunoterapia (T0) e 90 dias após tratamento (T90). o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor vermelha (■) referente ao T0 e na cor verde (■) referente a T90.

Quando avaliado o ganho de massa corporal dos cães após a imunoterapia, foi observado que no grupo de cães que receberam apenas o adjuvante MPL como tratamento houve perda de massa corporal (13%) em relação ao tempo antes do tratamento, T0. Já no grupo de animais submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL, foi detectado um ganho significativo ($P < 0,05$) de massa corporal em torno de (32%) em relação a T0 e em relação ao grupo MPL em T90 (Figura 19A).

Em relação a avaliação da redução na intensidade e quantidade de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral canina utilizando o *score* clínico dos cães, foi observado que no grupo de animais que receberam o adjuvante MPL como tratamento houve pequena redução no percentual médio do *score* em T15 e T30. Entretanto, observamos que em T90 os animais apresentavam o *score* clínico semelhante ao observado no pré tratamento (T0) (Figura 19B). De forma surpreendente, o grupo de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL apresentou redução constante do percentual do *score* clínico logo após a imunoterapia (T15), e este foi mais evidente ao fim do acompanhamento experimental apresentando redução média na intensidade e presença de sinais clínicos em torno de 75% (T90) (Figura 19B).

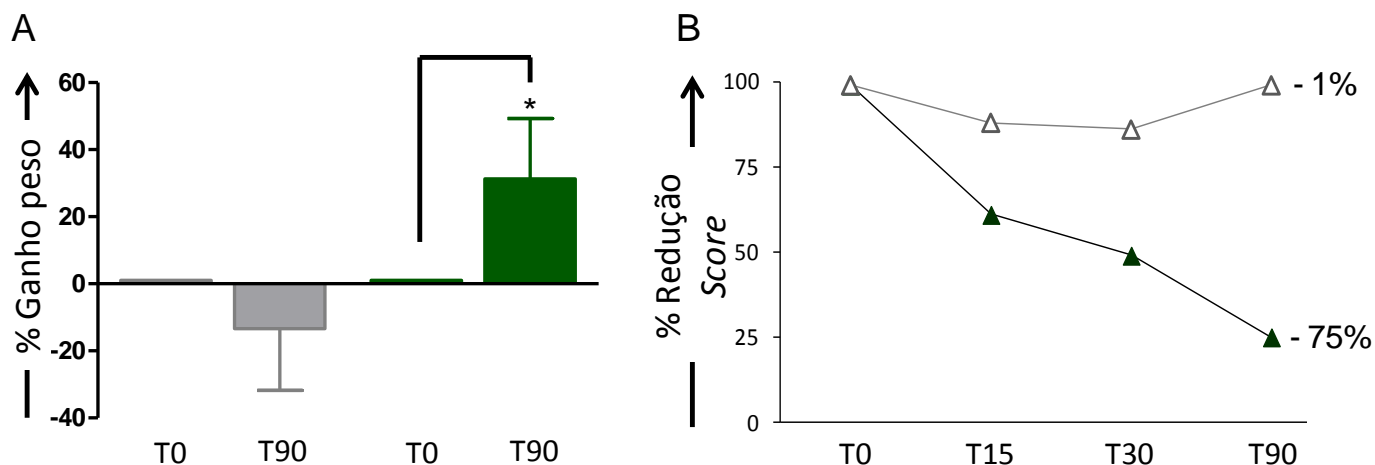


Figura 19: Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. (A) Gráfico representativo do percentual de ganho de peso dos animais, antes da imunoterapia (T0) e 90 dias após tratamento (T90). O grupo MPL está representado pelas barras na cor cinza (■); o grupo LBMPL está representado pelas barras na cor verde (■). (B) Gráfico representativo do percentual de redução do *score* clínico nos tempos T0 e 15 dias (T15), 30 dias (T30) e 90 dias (T90) após a imunoterapia. O grupo MPL está representado pelo triângulo de cor cinza (△); o grupo LBMPL está representado pelo triângulo de cor verde (▲). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelo * relacionado ao percentual de ganho de peso em T90 entre o grupo MPL e LBMPL e pela linha conectora relacionado aos tempos T0 e T90 no grupo LBMPL.

A Prancha 1 demonstra a evolução clínica de um animal do grupo MPL em T0 e aos 90 dias após a imunoterapia, onde não se observa melhora do quadro clínico do animal. Já a Prancha 2 ilustra a evolução clínica de um animal do grupo submetido à imunoterapia com a vacina LBMPPL antes e após a imunoterapia, T0 e T90 respectivamente. É possível observar uma melhora clínica considerável, com resultados próximos de uma completa remissão dos sinais clínicos, como observado nas lesões dermatológicas (Prancha 2).



Prancha 1: Cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL. (A), (C) e (E) representam fotos do animal C1 antes do tratamento (T0). Presença de lesão crostosa no focinho, pelagem opaca com dermatite seborréica e despigmentação na região do focinho. (B), (D) e (F) representam fotos do animal C1 90 dias após a imunoterapia (T90). Presença de lesão no focinho com área maior de despigmentação, pelagem opaca com extensas regiões de alopecia na parte posterior, anterior e emagrecimento acentuado.



Prancha 2: Cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com a vacina LBMPL. (A), (C) e (E) representam fotos do animal V2 antes do tratamento (T0). Presença de lesão crostosa no focinho, conjuntivite mucopurulenta, lesão de ponta de orelha com perda de pêlo e região considerável de vasculite além de lesão de ponta de rabo com região necrosante e perda total da pelagem local. (B), (D) e (F) representam fotos do animal V2 90 dias após a imunoterapia (T90). Ausência de conjuntivite com regressão total de lesões do focinho, regressão de lesão de ponta de orelha e de ponta de rabo com reconstituição de pelagem local.

6.2.2 - Avaliação da esplenomegalia por ultrassom

A esplenomegalia é um dos achados mais importantes na LV, sendo um órgão alvo do parasito. Tanto o fígado como o baço respondem a intensa replicação do parasito hiperplasiando e hipertrofiando, resultando num aumento considerável destes órgãos possibilitando de serem observados por apalpação. O uso do ultrassom portátil, permite uma avaliação mais precisa das alterações sugestivas de megas, pois com o auxílio da imagem é possível mensurar como o baço responde as intervenções terapêuticas de forma mais precisa. Assim, no presente estudo, empregamos a ultrassonografia para avaliar se o baço foi capaz de reduzir seu volume após 90 dias da intervenção com a vacina terapêutica LBMPL. Adicionalmente, o ultrassom foi empregado para guiar a punção aspirativa do baço permitindo a realização de uma biopsia esplênica antes e após o tratamento.

A punção aspirativa do baço guiada por ultrassom apresentou segurança e eficácia nos dois momentos em que foi utilizada, antes e após 90 dias da imunoterapia, não havendo registro de intercorrências, como hemorragia esplênica, ou rupturas parciais do órgão em nenhum dos animais submetidos ao procedimento. A avaliação do baço pela ultrassonografia revelou em relação ao grupo submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL, ausência de alteração sugestiva de esplenomegalia em 60% (3/5) dos animais (baço normal) e alteração sugestiva de esplenomegalia em 40% (2/5) dos cães sendo esta distribuída em 20% (1/5) apresentando alteração leve e 20% (1/5) alteração moderada. Quando os mesmos animais foram avaliados 90 dias após terminado o protocolo de tratamento, foi observado uma evolução da esplenomegalia nos animais sendo que 100% dos cães demonstravam alteração sugestiva de esplenomegalia com 20% apresentando alteração leve, 40% alteração moderada e 40% alteração importante (Figura 20).

Em relação ao grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL foi possível observar em T0 ausência de alteração sugestiva de esplenomegalia em 22% (2/9) dos animais (baço normal) e alteração sugestiva de esplenomegalia em 78% (7/9) dos cães sendo esta distribuída em 11% (1/9) apresentando alteração leve, 22% (2/9) alteração moderada e 45% (4/9) apresentando alteração sugestiva de esplenomegalia importante (Figura 20). De forma interessante, após 90 dias do tratamento com o vacina LBMPL os animais apresentaram melhora considerável no quadro sugestivo de esplenomegalia. Em T90, foi observado que 33,5% (3/9) dos animais já não apresentavam alteração sugestiva de esplenomegalia (baço normal). Além disso, 33,5% (3/9) dos animais apresentavam

alteração leve, 22% (2/9) alteração moderada e apenas 1 animal (11%) apresentando alteração sugestiva de esplenomegalia importante (Figura 20).

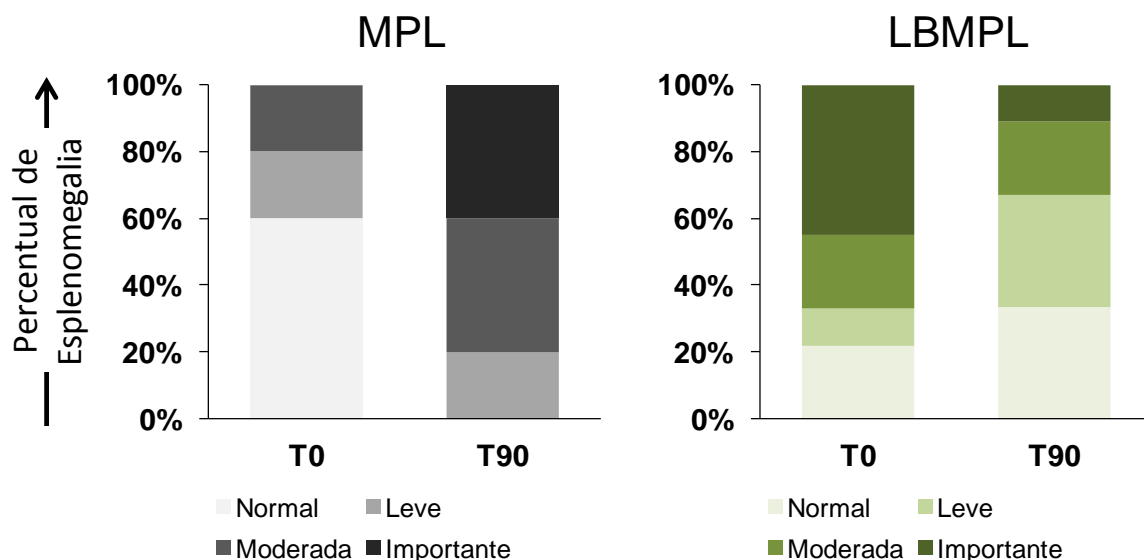
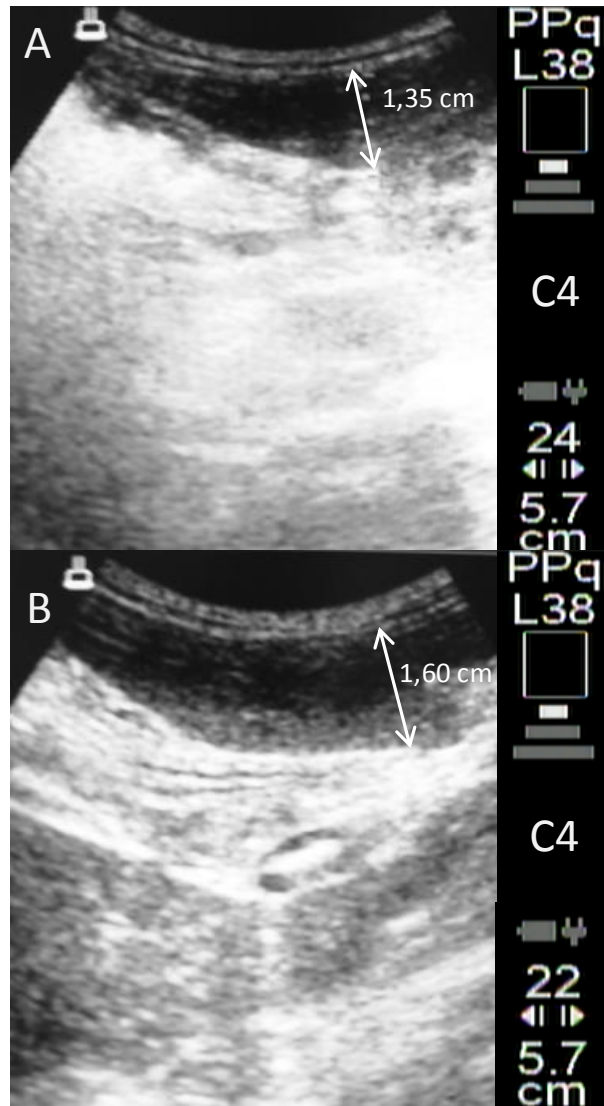
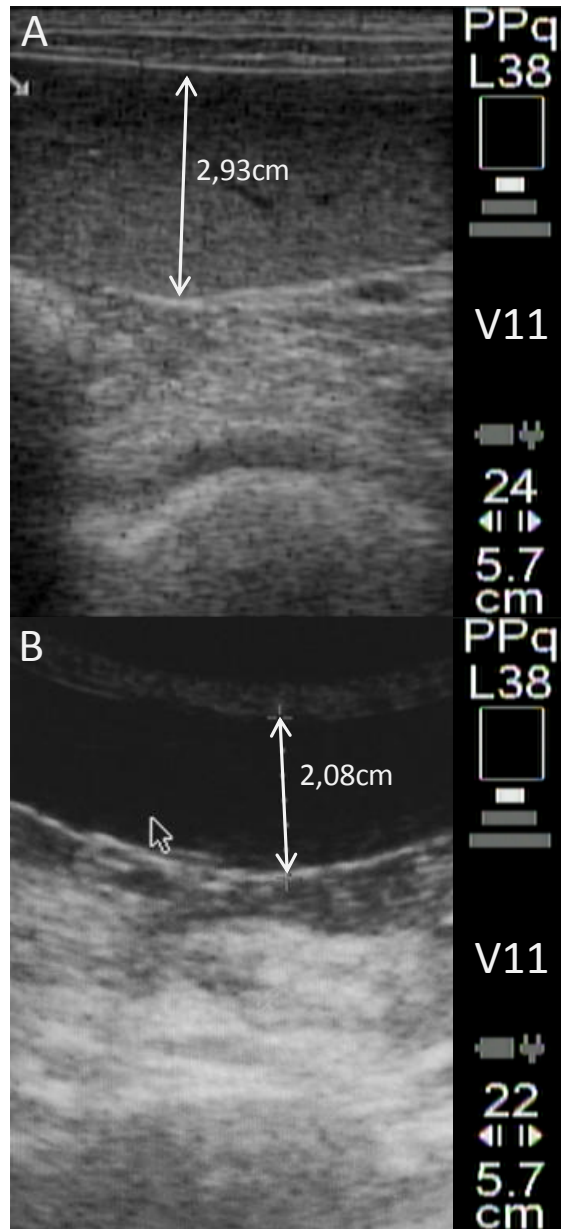


Figura 20: Avaliação da esplenomegalia em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O grupo MPL (n=5) está representado pelas barras na escala de cinza; o grupo LBMPL (n=9) está representado pelas barras na escala de verde. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os percentuais de animais classificados de acordo com a ausência de esplenomegalia (normal), esplenomegalia leve, moderada e importante.

Na Prancha 3 é apresentada a imagem ultrassonográfica do baço de um animal do grupo MPL em T0 e aos 90 dias após a imunoterapia, em que é possível notar o aumento do volume do órgão em T90. Já a Prancha 4 ilustra a imagem ultrassonográfica do baço de um animal do grupo LBMPL em T0 e aos 90 dias após a imunoterapia, onde se nota redução no volume do órgão em T90.



Prancha 3: Imagem por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com o adjuvante MPL. (A) Antes do tratamento (T0). Note volume do órgão normal (distância entre as bordas de 1,35 cm). (B) 90 dias após a imunoterapia (T90). Aumento do volume do órgão sugestivo de esplenomegalia moderada (distância entre as bordas de 1,60 cm).



Prancha 4: Imagem por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à imunoterapia com a vacina LBMPL. (A) Antes do tratamento (T0). Note aumento do volume do órgão sugestivo de esplenomegalia importante (distância entre as bordas de 2,93cm). (B) 90 dias após a imunoterapia (T90). Regressão do volume do órgão sugerindo ausência de esplenomegalia (distância entre as bordas de 2,08cm).

6.3 – Avaliação parasitológica pela PCR em tempo real

6.3.1 - Avaliação da carga parasitária no baço, pele e medula óssea

Atualmente, a PCR em tempo real vem sendo empregada para o diagnóstico bem como para monitoramento de tratamentos e/ou intervenções pós imunizações, no sentido de avaliar a 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 e baço, bem como em fragmento de pele da face interna da orelha direita antes da imunoterapia e aos 90 dias após conclusão do tratamento.

De uma forma geral os animais que receberam a imunoterapia com a vacina LBMPL apresentaram menor carga parasitária nos tecidos avaliados (medula óssea, baço e pele) quando comparado ao grupo de cães tratados apenas com MPL. De forma interessante, na avaliação da carga parasitária da medula óssea, observamos que 3/9 (33%) cães do grupo LBMPL não apresentaram positividade na reação de qPCR, tendo carga parasitária igual a zero. Além disso, observamos que a carga parasitária em T90 no grupo LBMPL foi sete vezes menor em relação ao grupo de cães tratados apenas com o adjuvante MPL neste tecido (Tabela 9).

Já na avaliação da carga parasitária no baço, foi observado que 2/9 (22%) cães do grupo LBMPL não apresentaram positividade na reação de qPCR, tendo carga parasitária igual a zero. Surpreendentemente, a carga parasitária em T90 no grupo LBMPL foi 42,5 vezes menor em relação ao grupo de cães tratados apenas com o adjuvante MPL no baço (Tabela 9).

Outro tecido avaliado em relação à carga parasitária foi a pele onde demonstramos que 2/9 (22%) cães do grupo LBMPL não apresentaram positividade na reação de qPCR, tendo carga parasitária igual a zero. Além disso, um animal que era negativo na análise de qPCR na pele continuou negativo ao fim do acompanhamento experimental. Em relação aos animais controle (MPL), foi observado que um animal negativo na análise de qPCR na pele continuou negativo ao fim do acompanhamento experimental. Entretanto, observamos que o número de cães positivos na reação de qPCR aumentou em relação ao tempo pré tratamento (T0) com 4/5 animais positivos em T90. Semelhantemente como observado no

baço, a carga parasitária da pele em T90 no grupo LBMPL foi 127,5 vezes menor em relação ao grupo de cães tratados apenas com o adjuvante MPL neste tecido (Tabela 9).

Tabela 9: Carga parasitária na medula óssea, baço e pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes e após imunoterapia com a vacina LBMPL e seu grupo controle.

Grupos/Cães		Carga Parasitária					
		Medula Óssea (/mL)		Baço (/mg)		Pele (/mg)	
		T0	T90	T0	T90	T0	T90
MPL	C1	1246	3299	109	28538	3899	183733
	C2	7184	963	18	140	0	0
	C4	1221	20999	10	250	0	23
	C5	1377	74850	10	12557	28	344216
	C6	4773	5133	8	206	566	105
	Total Cães (+)	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5	3 / 5	4 / 5
LBMPL	V1	100	0	3	3	420	47
	V2	8186	0	5	0	26687	114
	V4	12245	347	23	197	104	54
	V7	2618	0	24	3	0	0
	V10	7614	2752	5	10	65	0
	V11	24389	1103	125	416	327	4206
	V12	11678	16471	4	0	500	0
	V13	8564	1639	48	1107	2479	551
	V14	6624	4495	7	31	109	2494
	Total Cães (+)	9 / 9	6 / 9	9 / 9	7 / 9	8 / 9	6 / 9

Valores absolutos do número de amastigotas na medula óssea (amastigotas/mL), baço e pele (amastigotas/mg) de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. Em negrito estão representados os animais que apresentaram resultados parasitológicos negativos/carga parasitária igual a zero em algum dos tecidos avaliados.

Todos os animais alocados em ambos os grupos (MPL e LBMPL) apresentaram amastigotas no baço em T0 e não foi observada diferença nos valores de amastigotas/mg de tecido nos grupos MPL e LBMPL no tempo antes da imunoterapia. Quando avaliada a carga parasitária no grupo MPL foi observado aumento da carga parasitária neste grupo em T90 quando comparado ao tempo antes da imunoterapia com o adjuvante (Figura 21). Também foi observado que todos os animais deste grupo apresentaram amastigotas no baço ao fim do acompanhamento experimental. De forma interessante, foi observado redução na carga parasitária no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL em T90 (Figura 21).

Quando avaliada a carga parasitária na pele, não foi observada diferença nos valores de amastigotas/mg de tecido nos grupos MPL e LBMPL no tempo antes da imunoterapia. Além disso, não foi observada diferença na carga parasitária no grupo MPL entre os tempos antes do tratamento e em T90 (Figura 21). De forma interessante, assim como no baço, foi observada redução na carga parasitária no grupo LBMPL quando comparado ao grupo MPL em T90 (Figura 21).

Já em relação a carga parasitária na medula óssea, não foi observada diferença nos valores de amastigotas/mL de tecido nos grupos MPL e LBMPL no tempo antes da imunoterapia (T0). Além disso foi observado que todos os animais apresentaram amastigotas neste órgão em T0 (Figura 21). Já quando avaliado o grupo de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL, foi observada redução da carga parasitária neste tecido no tempo de 90 dias após o tratamento em relação ao tempo antes da imunoterapia (T0) e em relação ao grupo MPL (T90) (Figura 21).

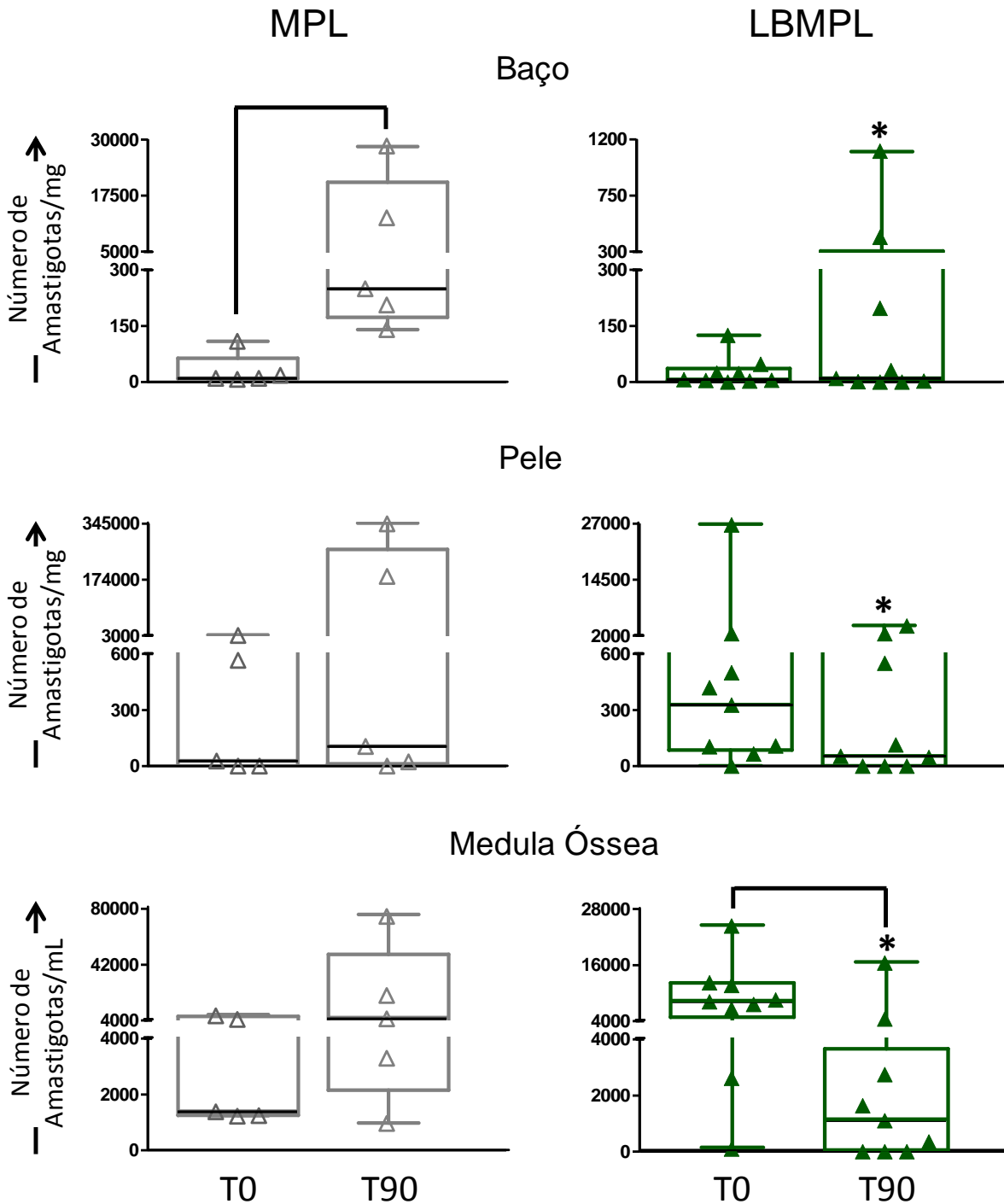


Figura 21: Avaliação da carga parasitária no baço, pele e na medula óssea em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL e submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL apenas. O grupo MPL está representado pelos triângulos de cor cinza (\triangle); o grupo LBMPL está representado pelos triângulos de cor verde (\blacktriangle). O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T90 = 90 dias pós imunoterapia. O eixo y representa o número de amastigotas/mg de tecido (baço e pele) e o número de amastigotas/mL (medula óssea) (mediana e valor máximo e mínimo). As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pela **linha conectora** relacionado aos tempos T0 e T90 e pelo * relacionado às diferenças significativas ($P < 0,05$) em T90 entre o grupo MPL e LBMPL.

Estes resultados demonstram o importante efeito da imunoterapia utilizando a vacina LBMPL sobre a LVC ativa, sugerindo que este imunobiológico tem ação efetiva na regressão de sinais e sintomas clínicos e da carga parasitária na doença.

7. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, que afeta principalmente os países mais pobres, sendo que 59.000 pessoas morrem anualmente de LV dentre as quais 35.000 são homens e 24.000 mulheres, e mesmo com os avanços científicos relacionados ao diagnóstico, tratamento e prevenção ocorridos nos últimos 10 anos, mostra taxas de morbimortalidade com preocupante tendência ao crescimento (WHO 2010). Em termos globais a leishmaniose é a terceira mais importante doença transmitida por vetor, depois da malária e filariose (Reithinger & Davies 2002) e está entre as seis maiores endemias mundiais (WHO, 2010). Epidemias urbanas de LV são observadas em várias cidades do Brasil e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS, à semelhança do que se observa no sul da Europa onde cerca de 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos estão associados com a infecção pelo HIV. Estima-se que a infecção HIV/*L. infantum* aumenta o risco em 100 a 2.320 vezes de se desenvolver uma LV grave. De 2001 a 2005 foram notificados 16.210 casos de LV no Brasil, sendo que 315 (2%) destes apresentavam co-infecção com HIV (Elkhoury *et al.* 2007). Um dos possíveis motivos desta elevada prevalência HIV/*Leishmania*, é a expansão simultânea da leishmaniose para o ambiente urbano e do HIV/AIDS para o meio rural, levando a sobreposição de áreas geográficas, favorecendo os casos de co-infecção (Alves & Bevilacqua, 2004).

Outro problema atual que tem agravado a situação da LV no mundo está associado ao grande número de pacientes não responsivos a quimioterapia convencional com antimoniais, sugerindo o aparecimento de cepas resistentes do parasito (Croft *et al.*, 2006). Por estes motivos, há uma variação regional na resposta ao tratamento em pacientes com LV, e as recomendações no uso de medicamentos e esquemas terapêuticos, podem variar nas diferentes regiões do globo acometidas por esta doença (Chakravarty *et al.*, 2010). Estes e outros problemas enfrentados no tratamento da LV têm levado pesquisadores a buscar novas estratégias de tratamento para a doença. Neste sentido, o uso de vacinas terapêuticas e administração de imunobiológicos têm ganhado grande atenção no tratamento das Leishmanioses. Essa estratégia, conhecida como imunoterapia (bioterapia) abrange a utilização de substâncias biológicas e/ou imunobiológicos que de um modo geral atuam na modulação ou modificam as respostas imunológicas, a fim de atingir um objetivo profilático e/ou terapêutico (Okwor *et al.*, 2009). Os agentes imunoterápicos podem exercer seu efeito por ação direta ou indireta, aumentando as defesas naturais e restabelecendo as funções efetoras deficientes (Oldham *et al.*, 2006).

Além da imunoterapia, a imunoquimioterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, principalmente nas formas mais graves da Leishmaniose (Musa et al., 2010). Dentre as alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento da LV estão: 1) imunoterapia utilizando-se vacinas ou imunomoduladores tais como citocinas e/ou anticorpos monoclonais anti-citocinas e/ou anticorpos monoclonais anti-receptores de citocinas; 2) associação de fármacos ou mesmo de imunofármacos; 3) a imunoquimioterapia, que pode ser empregada associando imunomoduladores a fármacos concomitantemente (Murray et al., 2002; Santos, et al., 2007; Miret et al., 2008; Borja-Cabrera et al., 2010; Musa et al., 2010; Gautam et al., 2011).

No entanto, uma das grandes limitações para atingir êxito no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para leishmaniose visceral são os modelos experimentais empregados nos ensaios pré-clínicos. Estes ensaios consistem basicamente na avaliação de diferentes propostas terapêuticas em modelos experimentais que reproduzam os principais eventos clínico-patológicos decorrentes do curso natural da infecção. Nesse sentido, nosso estudo buscou avaliar a estratégia de tratamento empregando uma vacina terapêutica composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (vacina LBMPL) no modelo cão, que é "**considerado um dos melhores modelos experimentais para LV humana, pois apresenta características clínico-patológicas extremamente semelhantes à doença humana ativa**" (Genaro, 1993; Moreno & Alvar, 2002; Alvar et al., 2004; Reis et al., 2006a; Reis et al., 2009). Dessa forma, cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos foram usados neste trabalho afim de se avaliar a eficácia terapêutica da vacina LBMPL. A seguir serão discutidos os resultados obtidos neste estudo principalmente sob os aspectos laboratoriais, clínicos e parasitológicos.

Inicialmente, todos os 16 animais selecionados para este trabalho, passaram por um rigoroso critério de inclusão abrangendo: dois testes sorológicos padrões positivos recomendados pelo Ministério da Saúde (ELISA, RIFI e DPP[®]), realizados pelo CCZ de Governador Valadares, MG e pelo Laboratório de Pesquisas Clínicas/EF/UFOP respectivamente; exames parasitológicos (isolamento em NNN/LIT e moleculares por qPCR) positivos realizados no laboratório de Imunopatologia/NUPEB/UFOP e no Laboratório de Pesquisas Clínicas EF/UFOP (Tabela 6); e sinais clínicos sugestivos de LVC sintomática mostrado ao exame físico realizado por um médico veterinário. Todos estes critérios e testes de diagnóstico foram fundamentais para confirmação da presença da

L. infantum nos animais e garantia de que os cães estavam infectados ao darmos início aos experimentos.

Houve concordância entre os exames sorológicos prévios realizados pelo CCZ-GV com o teste rápido imunocromatográfico DPP[®] (Bio-Manguinhos[®]) preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde. Além disso, houve concordância dos testes sorológicos com os testes parasitológicos realizados em aspirados de medula óssea. Em todos os cães, todos os testes sorológicos (RIFI, ELISA e DPP[®]) foram positivos. Em relação aos testes parasitológicos, foi observado que no isolamento do parasito em NNN/LIT, o grupo MPL apresentou 4/6 (67%) dos animais com amostras positivas enquanto no grupo LBMPL 7/10 (70%) foram identificados com parasitos em meio de cultura. Estes dados corroboram com Reis et al. (2006) que demonstraram que cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando a forma clínica oligossintomática ou sintomática são altamente positivos para isolamento do parasito na medula óssea. Entretanto, quando utilizada uma metodologia mais sensível para detecção do parasito, como é o caso da detecção molecular por qPCR em tempo real, foi observado 100% de positividade nas amostras de aspirados de medula óssea dos cães. Estes dados nos permitiram reforçar o diagnóstico de LVC em todos os cães confirmando a infecção ativa dos mesmos.

Em uma primeira abordagem investigativa, buscou-se avaliar as principais alterações hematológicas e bioquímicas séricas dos cães submetidos à imunoterapia com a vacina LBMPL bem como do grupo tratado apenas com o adjuvante MPL. Estas avaliações são de extrema importância para o estudo da leishmaniose visceral seja humana ou canina. Estes parâmetros, servem como biomarcadores de monitoração do diagnóstico e prognóstico da evolução do quadro clínico, na identificação de formas graves e no acompanhamento em relação à resposta terapêutica na doença. Embora, a avaliação do quadro hematológico forneça pouco valor para o diagnóstico na LV, estes parâmetros apresentam relevância no acompanhamento do estado clínico, com um forte valor prognóstico, sendo importantes parâmetros 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).

Na história natural da LV seja ela humana e/ou canina, observa-se a formação de um quadro hematológico grave, marcado por uma forte imunossupressão revelada pelo hemograma como pancitopenia. Já com relação a série vermelha, pacientes com LV ativa e grave exibem anemia normocítica, normocrômica, e ainda com valores diminuídos de hemoglobina e hematócrito. Com relação à série branca o quadro se agrava ainda mais, pois geralmente na LV ativa a doença apresenta-se com um quadro de imunossupressão marcada por uma forte queda nos valores globais de leucócitos (leucopenia) caracterizados por diminuição de monócitos (monocitopenia), linfócitos (linfopenia), eosinófilos (eosinopenia) e por vezes ocorre aumento de neutrófilos (neutrofilia) ou mesmo queda de neutrófilos (neutropenia), como relatado por diversos autores (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Ciaramella *et al.*, 1997; Pastorino *et al.*, 2002; Feitosa *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006a; da Costa-Val *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010).

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, afim 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 acima mencionados. Em relação ao leucograma, não foi observada alteração em relação aos valores de referência (VR) nos dois grupos experimentais durante todo o acompanhamento do estudo. Entretanto pequeno aumento na global de linfócitos e monócitos e queda nos valores de eosinófilos foram os achados marcantes nos animais submetidos à imunoterapia com a vacina LBMPL. 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 apresentando baixo parasitismo demonstravam aumento nos valores globais de monócitos e linfócitos quando comparados ao grupo de cães com alto parasitismo. Por outro lado estes mesmos autores, mostraram em um outro trabalho, cujo enfoque era avaliar o quadro bioquímico hematológico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas da LVC, que cães sintomáticos apresentavam leucopenia caracterizada por monocitopenia, linfopenia e eosinopenia (Reis *et al.*, 2006b).

Alguns estudos que buscaram avaliar a quimioterapia com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas micro e nanométricos em cães portadores de LV,

não foram capazes de detectar alterações significativas no leucograma dos cães após o tratamento (da Costa-Val, 2004; Ribeiro et al., 2008; da Silva, 2011). Jamshidi et al. (2011) ao avaliarem a imunoterapia em cães experimentalmente infectados, demonstram que há uma normalização tanto do leucograma quanto do eritrograma nos animais após a conclusão dos protocolos terapêuticos. Esta normalização também é observada em pacientes humanos submetidos a quimioterapia convencional e a imunoquimioterapia (Badaro et al., 1990; Souza et al., 2012).

Em relação ao eritrograma, observamos que apenas os cães submetidos à imunoterapia com a vacina LBMPL tiveram os valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas reestabelecidos. Já o grupo de cães submetidos ao tratamento com adjuvante MPL permaneceram com estes parâmetros abaixo dos valores normais de referência caracterizando um quadro de anemia e plaquetopenia ao fim do acompanhamento experimental. O que se observa na leishmaniose visceral humana como quadro mais comum em relação ao eritrograma é anemia normocítica e normocrômica. Em uma fase mais avançada (LVH grave) pode ser observada anemia microcítica e hipocrômica (Singh et al., 1999; Queiroz et al., 2004; Varma & Naseem 2010) levando a um quadro de descompensação hemodinâmica. Além disso, são observados quadros de plaquetopenia que podem levar a distúrbios hemorrágicos sérios (Queiroz et al., 2004; Varma & Naseem 2010).

Assim como na doença humana, a doença canina (LVC) apresenta em seu 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). Além disso, a plaquetopenia é uma característica marcante em animais sintomáticos. 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. Dessa forma, observamos que o quadro hematológico apresentado pelos cães imunotratados com a vacina terapêutica LBMPL segue para um restabelecimento destes parâmetros, quadro este compatível com aquele também observado em pacientes tratados.

Diferentes padrões nos parâmetros hematológicos e bioquímicos podem ser observados como resultado de lesão celular (hepatocelular) ou disfunção orgânica. Estes padrões refletem tanto o extravasamento de constituintes celulares para o soro quanto à produção e excreção de vários componentes séricos. Além disso, na LV é observado aumento exacerbado na produção de imunoglobulinas, caracterizando um quadro denominado "expansão policlonal de linfócitos B". Este quadro leva a produção aumentada de todas as classes de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgM, IgGs). Como resultado desta hipergamaglobulinemia, há a formação de imunocomplexos que podem se depositar em órgãos e tecidos, causando sérios danos ao hospedeiro (Alvar et al., 2004; Plevraki et al., 2006; da Costa-Val et al., 2007; Reis et al., 2009; Agenor et al., 2009; Clementi et al., 2011). Um órgão bastante afetado é o rim e a avaliação da função deste órgão é fundamental em pacientes sob tratamento na LV, seja pelo dano renal causado pelo processo imunopatológico descrito acima, ou pelas complicações renais decorrentes da toxicidade de drogas como os antimoniais e a Anfortericina B desoxicolato (Plevraki et al., 2006). Em relação aos parâmetros bioquímicos utilizados para acompanhar os efeitos da imunoterapia sobre a função renal dos animais, foram avaliadas as concentrações séricas de uréia e creatinina. Não foram observadas alterações em relação as concentrações de creatinina nos animais dos dois grupos experimentais quando comparado aos valores de referência. Já a análise sérica de uréia demonstrou que os cães imunotratados com a vacina LBMPL apresentaram normalização deste parâmetro após o tratamento enquanto os cães tratados apenas com o adjuvante MPL revelaram alteração renal, uma vez que houve aumento de seus níveis séricos (uréia).

Na LVH, em um estudo com 50 pacientes portadores da doença sintomática, foi demonstrado que 8,5% destes apresentaram dosagem de uréia elevada e 16,3% com dosagem de creatinina aumentada (Dutra et al., 1985). Segundo, Nieto et al. (1992), em estudo com 10 cães infectados, sete apresentaram dosagem sérica de uréia aumentada e três com dosagem de creatinina elevada. Da Silva, (2011) observou aumento nas concentrações séricas de uréia em cães submetidos ao tratamento com antimoniato lipossomal, justificando que este parâmetro não acompanha a resposta clínica durante o tratamento na LVC. A avaliação da função renal é de extrema importância na LV e como foi observado, a imunoterapia teve efeito benéfico sob esta, enquanto os cães tratados apenas com MPL apresentaram quadro similar a pacientes com a forma ativa da doença. Tais resultados,

mostram que o uso da vacina terapêutica não causa dano renal, como ocorre na quimioterapia convencional.

As alterações nas concentrações das enzimas aminotransferases séricas (ALT ou TGP e AST ou TGO), gama glutamiltranspeptidase (Gama-GT) e da fosfatase alcalina (FA) são consideradas importantes biomarcadores de lesões nas células hepáticas. Em nosso estudo, não foram observadas alterações nos valores séricos de ALT ou TGP, AST ou TGO e Gama-GT após a imunoterapia. De forma semelhante, Miret et al. (2008) e Trigo et al. (2010) avaliando protocolos de imunoterapia e imunoquimioterapia em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, também não observaram alterações nas concentrações séricas das enzimas hepáticas nos animais antes e após os protocolos de tratamento. Corroborando com estes achados, da Silva (2011) utilizando diversos protocolos de tratamento quimioterápicos em cães com LV, também não observaram alterações nas dosagens dessas enzimas. 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).

A fosfatase alcalina é sintetizada quase que totalmente pelos hepatócitos, e uma pequena parte nos osteoblastos e nos epitélios intestinal e renal. Em relação a avaliação da fosfatase alcalina, foi observado no grupo de cães submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL aumento nos seus níveis séricos em T90. Este achado poderia indicar o início de uma possível alteração ou dano hepático nestes animais principalmente causado pela presença e intensa replicação do parasito neste tecido. Entretanto, uma análise parasitológica deste tecido seria necessária para confirmar esse achado. Outra parâmetro importante a ser avaliado na LV é a dosagem sérica de bilirrubina. Sabe-se que ela eleva-se no soro na presença de lesões hepáticas, obstrução biliar ou quando a velocidade de destruição dos glóbulos vermelhos está aumentada. Como foi observado em nosso estudo, houve uma normalização na concentração de bilirrubina no soro dos cães imunotratados com a vacina LBMPL indicando restauração da função hepática com restabelecimento das condições fisiológicas deste órgão.

Em nosso estudo a função hepática foi uma ferramenta útil, que serviu para avaliar a toxicidade do protocolo imunoterapêutico proposto. Esses achados vem de acordo com estudo recente utilizando o imunomodulador P-MAPA (agregado protéico obtido da fermentação do fungo *Aspergillus oryzae*) em cães portadores de LV sintomática onde não foram observadas reações hepatotóxicas à imunoterapia (Santiago et al., 2013).

Em relação aos níveis de proteínas totais, albumina, globulina bem como da razão albumina/globulina (A/G) foi observado que no grupo de animais submetido a imunoterapia com a vacina LBMPL apenas o parâmetro globulina mostrou-se aumentado em 30 e 90 dias do tratamento. Nossos achados indicam uma normalização parcial no proteinograma dos animais imunotratados com LBMPL e que esta melhora acompanhou a dos demais parâmetros hematológicos e bioquímicos. Uma justificativa plausível para o aumento de globulina sérica está no fato que a vacina LBMPL é composta por antígenos totais de *L. braziliensis* e que estes componentes teriam a capacidade de estimular não só a resposta celular como também a resposta humoral através da produção de imunoglobulinas. Além disto, é possível que o tempo avaliado neste estudo (90 dias após o tratamento) não seja suficiente para reduzir totalmente a atividade policlonal, e consequentemente restaurar os valores do proteinograma.

Entretanto, quando avaliado o grupo de cães submetidos ao tratamento apenas com o adjuvante MPL, observamos que houve redução nos níveis de albumina, aumento nos níveis de globulina e diminuição da razão albumina/globulina (A/G). Este padrão de alteração no proteinograma é característico da LVC sintomática indicativo de mau prognóstico para estes animais (Reis et al., 2006). Já na LV humana grave, Costa (2009) observou que os níveis séricos de albumina estiveram negativamente relacionados ao óbito, à presença de edema nos pacientes e aos níveis de aminotransferases hepáticas.

A natureza da resposta imune contra parasitos do gênero *Leishmania* spp. é muito complexa e diversos fatores incluindo espécies e cepas, insetos vetores e genética do hospedeiro influenciam no desenvolvimento da doença. Além disso, tanto a resposta imune inata quanto adaptativa são consideradas pontos chave na determinação do processo de infecção pelo parasito (Okwor & Uzonna, 2009). Muito do que se sabe sobre a imunologia da leishmaniose vem de estudos em modelos murinos (BALB/c e C57BL/6), particularmente da infecção por *L. major*. Em relação a LV, que afeta principalmente órgãos viscerais, a resistência e/ou susceptibilidade à doença está diretamente relacionada ao tipo e qualidade da resposta imune nos órgãos infectados o que é denominado de

resposta imune compartimentalizada (Liew & O'Donnell, 1993; Reis et al., 2009). Sabe-se que ambos os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são ativados na leishmaniose visceral e que participam cooperativamente na resolução da infecção (Alexander et al., 2001). Além disso, parece que as células T CD4⁺ estão mais presentes no controle das infecções primárias e as células T CD8⁺ se destacam durante a resposta secundária frente a infecção, ou seja, carregando um forte componente de memória (Alexander et al., 2001).

Considerando a relevância dos estudos da resposta imune na leishmaniose visceral, a análise do perfil fenotípico celular foi realizada neste estudo através da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos do sangue periférico, *ex vivo*. Com essa abordagem, foi possível observar quais modificações estariam ocorrendo em diversas populações e subpopulações celulares leucocitárias após a imunoterapia nos grupos avaliados. Neste sentido, foi observado em nosso estudo, aumento de linfócitos T totais (T CD3⁺) após a imunoterapia com a vacina LBMPL acompanhado de aumento das subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (30 dias após a imunoterapia). Reis et al. (2009) demonstraram numa avaliação *ex vivo*, que animais com LV em sua forma assintomática apresentam como biomarcadores de resistência, aumento de linfócitos T e de suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺). Em contrapartida, animais sintomáticos desenvolvem perfil de susceptibilidade e apresentam redução de linfócitos T e de suas subpopulações. Em um estudo utilizando a imunoterapia com a vacina FML, Borja-Cabrera et al. (2004) demonstraram que os cães imunotratados apresentaram aumento de células T (CD5⁺) acompanhado das subpopulações de CD4⁺ e principalmente de CD8⁺. Além disso, os animais apresentaram melhora clínica considerável e não foram registradas mortes até 22 meses após a imunoterapia, cujo grupo não tratado apresentou 40% de óbitos em relação à LV. Em uma publicação recente, avaliando a imunoterapia com P-MAPA em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, Santiago et al. (2013) observaram aumento de linfócitos T CD8⁺ nos animais imunotratados quando comparado ao grupo de cães controle, que receberam apenas salina. Além disso, eles observaram aumento discreto na população de células T CD4⁺, entretanto, este aumento não foi significativo (Santiago et al., 2013).

Hailu et al. (2005) avaliando pacientes com LVH, observaram que apenas pacientes tratados que responderam a quimioterapia, apresentavam aumento de linfócitos T CD3⁺ e das suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺) quando comparado a pacientes com infecção aguda, assintomáticos e infecção crônica. Diante dos resultados expostos, verificamos que

o comportamento observado no grupo de cães tratados com a vacina terapêutica LBMPL é similar ao observado por outros autores que avaliaram imunoterapia bem como na quimioterapia convencional da LV humana. Assim, nosso estudo reforça o papel de linfócitos T e suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺) auxiliando o sucesso terapêutico e demonstrando que o sistema imune exerce importante papel neste contexto.

De forma interessante, na avaliação da população de células B (CD21⁺), foi observado em 90 dias após a imunoterapia, redução desta população celular no grupo tratado com a vacina LBMPL em relação ao seu grupo controle tratado apenas com o adjuvante MPL. 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 e a presença de sinais clínicos da doença. Santos et al. (2007) avaliando um protocolo imunoterapêutico com a vacina "Leishmune[®] enriquecida" com uma dose maior de saponina, em cães com LV não observaram diferença nos valores *ex vivo* de linfócitos B CD21⁺ em relação aos animais não tratados. De fato, os dados na literatura tratando sobre essa população celular são contraditórios e pouco explorados. Em nosso estudo, uma hipótese sugerida para a redução desta população de células no grupo imunotratado com a vacina LBMPL em T90 seria a hipersensibilização destas células, durante o esquema de vacinoterapia que poderiam levar a morte os clones "inespecíficos", direcionando uma resposta humoral mais efetiva.

A avaliação da razão linfócitos T/linfócitos B (razão T/B) e a razão linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺ (razão CD4/CD8) re-enfatizaram os resultados observados com as populações isoladamente. O grupo de cães submetidos à imunoterapia com LBMPL apresentaram diminuição da razão CD4/CD8 em T90. Tal diminuição está diretamente associada ao aumento nas células T citotóxicas, responsáveis pelo controle do parasito e proteção na LVC (Reis et al., 2006b). Além disso, o aumento na razão T/B observada neste grupo de cães (LBMPL) sugere papel importante das células T na melhora clínica observada nos animais reforçando a ação benéfica da imunoterapia.

A ativação de macrófagos, o principal alvo da *Leishmania*, representa o primeiro evento para o disparo da resposta imune inata contra infecções intracelulares. Estes macrófagos produzem IL-12 que é fundamental para produção de IFN- γ e pela atividade citotóxica de células NK assim como para o desenvolvimento de resposta do tipo 1 (Prajeeth et al., 2008). Nesse contexto, as células NK tem um importante papel na integração da resposta imune inata e adaptativa seja produzindo citocinas do tipo 1 (TNF- α

e IFN- γ), seja pela lise de macrófagos infectados no tecido (Harms et al., 1991). Em nosso estudo foi observado que a imunoterapia com a vacina LBMPL promoveu aumento de células NK circulantes que foi mantido até o fim do acompanhamento experimental (T90). No modelo canino, são escassos os estudos que tratam do papel de células NK na LV. Em um estudo conduzido com um paciente apresentando a forma disseminada da leishmaniose e submetido a imunoquimioterapia demonstrou-se que o aumento de células NK circulantes bem como em biopsias das lesões foram associadas à cura clínica deste paciente (Pereira et al., 2009). Além disso, Peruhype-Magalhães et al. (2005) observaram que pacientes com a forma assintomática da LV ou tratados, apresentavam aumento de células NK produtoras de IFN- γ no sangue periférico após estimulação com ASLi. De fato, o aumento transitório após o tratamento quimioterápico na LV com posterior normalização do número de células NK no sangue periférico, prediz um bom prognóstico para o paciente (Cenini et al., 1993).

Com a finalidade de se estudar potenciais células apresentadoras de antígenos (APC) foi avaliado o número de monócitos CD14⁺ circulantes nos diferentes grupos antes e após a intervenção pela vacinoterapia. Foi observado que apenas o grupo de cães imunotratados com a vacina LBMPL apresentou aumento de monócitos circulantes em comparação à avaliação pré tratamento. Na LVC, alguns autores sugerem que a diminuição de monócitos CD14⁺ circulantes está diretamente associada à progressão da doença. Reis et al. (2006b) observaram redução nos valores de monócitos circulantes em cães apresentando a LV clássica e alta carga parasitária na medula óssea. Guerra et al. (2009) relataram em cães naturalmente infectados por *L. infantum* com alto parasitismo no baço, diminuição desta população celular. Em estudo de imunoquimioterapia na leishmaniose cutâneo-disseminada, Pereira et al. (2009) associaram a melhora clínica do paciente ao aumento de monócitos pró inflamatórios.

Dessa maneira, observamos que as alterações imunológicas no contexto *ex vivo* apresentadas pelos cães após a imunoterapia com a vacina LBMPL sugerem o direcionamento/restabelecimento para uma resposta imune protetora na LV. Além disso, os estudos humanos descritos anteriormente reforçam a similaridade na evolução imunológica nos cães doentes e imunotratados, justificando assim o uso deste modelo animal, e da avaliação imunofenotípica de leucócitos no contexto *ex vivo* em ensaios pré clínicos para LVH.

A fim de se complementar os estudos relacionados ao perfil imunofenotípico avaliado no contexto *ex vivo* em células circulantes, 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).

Uma segunda abordagem investigada em nosso trabalho foi a avaliação da atividade linfoproliferativa em CMSP após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi). A análise da resposta linfoproliferativa positiva frente ao estímulo com antígeno de *Leishmania*, é um biomarcador clássico de resistência, tanto na doença canina (Pinelli et al., 1994a; Solano-Gallego et al., 2000; Reis et al., 2009; Reis et al., 2010) quanto na LV humana (Badaro et al., 1990; Caldas et al., 2005). Em nosso estudo, observamos que os cães imunotratados com a vacina LBMPL apresentaram aumento da linfoproliferação após a imunoterapia (T90) quando comparado ao grupo MPL, e que este aumento foi marcado tanto por linfócitos T CD4⁺ como por linfócitos T CD8⁺-*L. infantum* específicos. Já foram relatados que cães naturalmente infectados e assintomáticos apresentam 98% de correlação entre IDR positiva e elevação nos índices de proliferação *in vitro* (Solano-Gallego et al., 2000). Em pacientes apresentando leishmaniose cutânea mucosa grave e a forma disseminada da doença, foi observado que após imunoterapia com vacina de *L. braziliensis* pasteurizada associada ao BCG houve positividade em relação à intradermorreação (IDR) com antígenos de *Leishmania* (Convit et al., 2004). Além disso, foi observado que após 10 meses da imunoterapia, todos os pacientes apresentaram remissão dos sinais e sintomas indicando cura clínica frente a doença (Convit et al., 2004). Mayrink et al. (2006) observaram que mais de 73% dos pacientes submetidos a imunoterapia vacinal tornaram a IDR positiva logo após o tratamento.

Borja-Cabrera et al. (2004), em um estudo utilizando a vacina FML, observaram reação positiva na IDR em cães imunotratados mesmo após 22 meses do tratamento. Miret et al. (2008), observaram que cães naturalmente infectados e tratados com a vacina Leish-111f + MPL e imunoquimiotratados, demonstraram atividade linfoproliferativa positiva frente ao ASLi, entretanto estes valores não foram considerados significativos. Já Boggiato et al. (2010) demonstraram aumento da atividade linfoproliferativa antígeno específica de linfócitos T CD4⁺ em cães com LV assintomática, sugerindo o papel fundamental destas células para o controle da doença e manutenção desta forma clínica. Em estudo utilizando uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada à saponina (vacina LBSap)

em cães, Roatt et al. (2012) observaram aumento da linfoproliferação em CMSP após estimulação com ASLi, caracterizado principalmente por linfócitos T CD8⁺-*L. infantum* específicos e redução da carga parasitária no baço destes animais. Esses resultados sugerem que a imunoterapia com a vacina LBMPL é capaz de estimular e manter uma resposta imunológica *Leishmania*-específica, reforçando a hipótese desse imunobiológico ser capaz de reverter o quadro clínico observado na doença e ainda contribuir no controle da replicação parasitária tecidual.

Recentemente, diversos estudos têm avaliado a resposta imunológica frente ao tratamento convencional na 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 a terapêutica 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 tem utilizado essa metodologia de forma mais restrita ou ampliada para avaliar, de forma mais pontual, o perfil de produção de citocinas na LV humana (Lagler et al., 2002; Peruhype-Magalhães et al., 2005; Hailu et al., 2005) e em estudos vacinais na LVC (Araújo et al., 2009; Araújo et al., 2011).

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). Já a citocina IL-4, parece estar associada a 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 kalazar (Kemp et al., 1993).

Em nosso estudo, foi possível avaliar e comparar o perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-4 estimulados *in vitro* com antígeno solúvel de *L. infantum*, nos diferentes grupos experimentais antes e após os protocolos de imunoterapia. Nossos resultados mostraram que, em relação aos linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ foi observado aumento dessas células em T90 no grupo de cães submetidos a imunoterapia com LBMPL quando comparado aos tempos pré (T0) e pós tratamento (T15 e T30) e em relação ao grupo MPL. Além disso, observamos aumento de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em T15 e T30 no grupo LBMPL em relação ao grupo MPL. De forma marcante, observamos que o grupo de animais tratados com LBMPL demonstraram redução dos linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ pós tratamento quando comparado ao grupo MPL (T15 e T30) e T CD8⁺IL-4⁺ em T90.

Estudos realizados por Peine et al. (2013) em camundongos infectados por *L. donovani* submetidos a imunoterapia com resiquimod lipossomal, observaram aumento de IFN- γ nos animais imunotratados. Boggiato et al. (2010) observou em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e assintomáticos, aumento desta citocina após estimulação antígeno específica 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 submetidos a quimioterapia convencional e curados e em pacientes com a forma assintomática da doença. Além disso, estes autores associaram como um dos principais achados, redução de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ a pacientes com perfil de resistência na doença (Hailu et al., 2005). Já Lagler et al. (2002), avaliando um paciente com LV sintomática, mostraram aumento de linfócitos T CD8⁺IL-4⁺ como um dos principais biomarcadores em relação à doença ativa.

Adicionalmente à avaliação individual de linfócitos T CD4 e T CD8 produtores de IFN- γ ⁺ e IL-4⁺, foi também calculada a razão de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ e T CD8⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺. Os dados obtidos em nosso estudo, reforçaram os resultados observados na produção de citocinas por estas duas subpopulações linfocitárias. Desta forma, foi possível observar aumento da razão T CD4⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ após a imunoterapia com a vacina LBMPL tanto quando comparado ao tempo pré tratamento quanto em relação ao grupo de cães controles, submetidos à imunoterapia apenas com o adjuvante MPL (T30 e T90). Além disso, a razão T CD8⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ foi aumentada em T15 e T90 no grupo LBMPL em relação ao grupo MPL e ao pré tratamento. Estes resultados corroboram com os dados observados em pacientes com LV clássica onde observa-se redução das razões T

CD4⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ e T CD8⁺IFN- γ ⁺/IL-4⁺ confirmando o papel de susceptibilidade da citocina IL-4 na doença anteriormente preconizado por Lagler et al. (2002).

A avaliação de citocinas produzidas por CMSP após estimulação *in vitro* demonstrou nos cães tratados com a vacina terapêutica LBMPL, aumento de TNF- α em T15 e T30 quando comparado ao grupo de cães tratados apenas com o adjuvante MPL, e normalização destes valores em T90. Sabe-se que o fator de necrose tumoral α (TNF- α) é o principal mediador da resposta inflamatória aguda. A maior fonte de TNF são as células mononucleares ativadas. Como já é sabido, o TNF estimula a migração de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, induz a expressão de moléculas de adesão e a secreção de quimiocinas pelo endotélio. Além disso, a ação sinérgica de TNF- α e IFN- γ são fundamentais para ativação macrófágica, lise e morte de *Leishmania* nos tecidos infectados, pois agem sinergicamente na via de ativação da iNOS (Brandonisio et al., 2001). Em um estudo avaliando a expressão de RNAm de citocinas em linfonodo de cães naturalmente infectados, Alves et al. (2008) relataram que cães assintomáticos apresentam aumento tanto de IFN- γ quanto de TNF- α . Estes autores sugerem que este aumento está relacionado ao controle do parasitismo neste órgão visto que, estes animais apresentaram menor carga parasitária quando comparado ao grupo de cães sintomáticos (Alves et al., 2008). Corroborando com estes resultados, Carrillo et al. (2007) também observaram aumento de TNF- α em cães assintomáticos quando comparado aos animais polissintomáticos. Já na leishmaniose visceral humana, Costa et al. (2013) observaram em soro de pacientes com a forma grave, correlação positiva entre TNF- α e IL-6, IL-10, IL-1b e IL-12. Os autores sugerem que estas citocinas sejam secretadas pelos mesmos tipos celulares, provavelmente macrófagos infectados no baço, fígado e medula óssea.

A avaliação na produção da citocina IL-10 em sobrenadante de CMSP dos diferentes grupos, foi observado redução na produção desta citocina apenas no grupo LBMPL em T90. Estudos avaliando a citocina IL-10 demonstram sua associação direta com a patogênese da LVH e LVC (Nylén & Sacks, 2007; Reis et al., 2010; Gautam et al., 2011). Dessa maneira, essa citocina atua de forma marcante, em diversos contextos da resposta imune do hospedeiro, dentre elas: (i) comprometendo a apresentação de antígenos pelas APCs; (ii) inibindo os mecanismos de co-estimulação e proliferação de células T; (iii) inibindo a secreção/produção de citocinas do tipo 1 e (iv) bloqueando a ativação macrófágica (Bogdan et al., 1991; Cenini et al., 1993; Ghalib et al., 1993; Karp et al., 1993; Miralles et al., 1994; Gassim et al., 1998; Barcellar et al., 2000; Belkaid et al., 2001;

Bhattacharyya et al., 2001; Moore et al., 2001; Murray, et al., 2002; Nylén & Sacks, 2007; Gautam et al., 2011). Panaro et al. (2009) demonstraram aumento na expressão de RNAm desta citocina em CMSP de cães sintomáticos quando comparado a cães assintomáticos após estimulação com ASLi. Alves et al. (2008) também relataram a expressão aumentada de IL-10 em linfonodos de cães apresentando a LV ativa. Já Boggiatto et al. (2010), observaram aumento nos níveis desta citocina em CMSP estimuladas com ASLi independente da forma clínica. Estudos atuais de imunoterapia na LV canina reforçam nossos resultados onde é observado redução na produção de IL-10 em CMSP de cães imunotratados (Santiago et al., 2013), melhora clínica dos animais e redução na carga parasitária. Na leishmaniose visceral humana, em pacientes tratados, observa-se redução dos níveis de IL-10 em plasma (Hailu et al., 2005) e em sobrenadante de CMSP (Caldas et al., 2005), confirmando a associação desta citocina na imunopatogenese da doença, principalmente na sua forma ativa e na LV grave. De fato, o estudo e a avaliação da resposta imune é fundamental para a pesquisa e no tratamento contra as leishmanioses, uma vez que sabemos que parte do sucesso no tratamento da LV vem da medicação e outra parte da modulação do sistema imune que em associação levam ao controle da infecção, a cura clínica e conseqüentemente ao sucesso terapêutico. Sendo assim, os resultados obtidos até o momento sugerem que a imunoterapia com a vacina LBMPL foi capaz de mobilizar nos animais uma resposta imune favorável ao controle da infecção por *L. infantum*.

A caracterização clínica pré-experimental minuciosa em relação aos achados no exame físico da população de cães selecionados para o presente estudo, foi realizada por um médico veterinário e refletiu de forma similar os dados da literatura que sugerem um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos clássicos da LVC, nos mais variados graus de acometimento e intensidade. Estas alterações, provavelmente, são consequência dos complexos mecanismos patogênicos decorrentes da visceralização em diferentes órgãos e da diversidade da resposta imune articulada por cada indivíduo, durante a evolução natural da doença, e que se traduzem nas manifestações clínicas observadas (Amusategui et al., 2003; Solano-Gallego et al., 2009; Reis et al., 2009).

Em nosso estudo, foram selecionados somente cães apresentando sinais clínicos sugestivos de LVC para compor os grupos experimentais, sendo excluídos cães não apresentando sinais/sintomas característicos da doença (assintomáticos). Esta escolha fez-se afim de mimetizar um paciente apresentando a forma mais clássica da leishmaniose visceral (LV crônica ou Calazar propriamente dito), caracterizando assim um paciente com

LV ativa. Nesse sentido, observamos que os cães imunotratados com a vacina LBMPL apresentaram redução na intensidade e na quantidade de sinais/sintomas clínicos da LV. Ao contrário, os animais submetidos ao tratamento com o adjuvante MPL evoluíram com mau prognóstico da doença.

Diversos pesquisadores têm demonstrado que a regressão das lesões e a melhora no aspecto clínico/físico de cães submetidos ao tratamento com fármacos convencionais é frequente (Baneth & Shaw 2002; Alvar et al., 2004; Noli & Auxilia 2005; Solano-Gallego et al., 2009; Manna et al., 2009; Miro et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2011; Rougier et al., 2012). Estudos avaliando a imunoterapia em cães com LV utilizando a vacina FML, hoje comercialmente conhecida como Leishmune[®], demonstraram redução gradativa dos sinais clínicos apresentados pelos animais, bem como ausência de morte no grupo de cães submetidos à imunoterapia (Borja-Cabrera et al., 2004). Posteriormente, Borja-Cabrera et al. (2010) comprovaram que não houve diferença na redução dos sinais clínicos apresentados por cães tratados com a vacina Leishmune[®] ou associada a quimioterapia com alopurinol. Estes autores concluíram que imunoterapia seria uma importante estratégia a ser implementada e administrada no tratamento da LVC, evitando assim o risco da geração de cepas resistentes do parasito com o uso da quimioterapia convencional que *per se* não tem logrado êxito (Borja-Cabrera et al., 2010). Uma avaliação de protocolo imunoquimioterapêutico com a vacina Leish-110f[®] + MPL-SE em cães com LV demonstrou redução dos sinais clínicos apresentados pelos animais e cura clínica/parasitológica (2/5) neste grupo. Entretanto, somente no grupo imunotratado com a vacina, não foram observados óbitos de animais ao fim do estudo (Miret et al., 2008). Em relação a leishmaniose visceral humana, estudos pioneiros conduzidos por Badaro et al. (1990) avaliando o tratamento imunoquimioterápico com antimoniato de meglumina e IFN- γ em pacientes com falha terapêutica e/ou LV grave, demonstraram cura clínica em cerca de 90% dos pacientes submetidos a este protocolo de tratamento. Estes autores sugerem que os percentuais elevados de cura clínica atingidos com este estudo foram em grande parte devido a imunoterapia usada (Badaro et al., 1990).

Além da redução na apresentação de sinais/sintomas clínicos pelos cães tratados com LBMPL, foi observada diminuição na intensidade das alterações clínicas remanescentes representada pelo *score* clínico. Em T90, foi observada uma redução marcante de cerca de 75% no *score* clínico do grupo LBMPL quando comparado ao tempo antes da imunoterapia. Estudos utilizando quimioterapia convencional reforçam o emprego

e a avaliação por *score* para acompanhamento da sintomatologia sugestiva de LV em cães (Manna et al., 2009; Miró et al., 2011; da Silva 2011). Assim, Trigo et al. (2010) observaram redução do *score* clínico em cães imunotratados com a vacina Leish-111f + MPL-SE registrando um percentual de cura clínica, igualmente ao observado por nós, de 75% nestes animais. Santiago et al. (2013) utilizando a classificação de *score* clínico segundo Solano-Gallego et al. (2009), observaram que cães tratados com o imunomodulador P-MAPA apresentavam restauração fisiológica, com redução drástica nos sinais/sintomas clínicos da doença e valores de *score* reduzidos, quando comparado ao grupo de cães não tratados.

O baço desempenha um papel central na LV, pois é um sítio para a geração de resposta imune específica contra o parasito mediada por células, podendo se tornar também um local de persistência do mesmo apresentando inúmeras alterações (Kaye et al., 2004). A esplenomegalia é uma destas alterações sendo considerada sinal clínico marcante tanto na leishmaniose visceral humana quanto canina (Badaro et al., 1990; Reis et al., 2009; Costa, 2009). Nesse sentido, em nosso trabalho foi avaliada a esplenomegalia nos cães dos diferentes grupos experimentais através da utilização de ultrassom portátil. Observamos que após a imunoterapia, os cães do grupo LBMPL apresentaram normalização do baço e redução na esplenomegalia em relação ao grupo de cães tratados apenas com MPL. Estudos utilizando antimoniato de meglumina lipossomal em cães com LV demonstraram que há redução da esplenomegalia nestes animais principalmente pelo controle do parasitismo (da Silva, 2011). Em humanos, a esplenomegalia está diretamente associada a complicações no quadro da leishmaniose visceral sendo a estabilização e normalização deste órgão, parâmetro de avaliação para sucesso no tratamento (Drumond & Costa, 2011).

Neste contexto, assim como na quimioterapia, a imunoterapia com a vacina LBMPL promoveu melhora clínica gradual em cães com leishmaniose visceral clássica (sintomática) com redução dos sinais/sintomas, diminuição do *score* clínico e redução da esplenomegalia sugerindo a efetividade terapêutica deste tratamento.

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* ligado à um plasmídeo, 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 avaliam o uso da qPCR na evolução do tratamento na LVC. Em sua maioria, estudos em cães submetidos a tratamento em clínicas veterinárias da Europa (Francino et al. 2006; Manna et al., 2008; Manna et al., 2009), estudos mais completos de novas formulações de antimoniato de meglumina (da Silva et al., 2012), além de alguns estudos de eficácia em vacinas (Roatt et al., 2012). Em nosso trabalho de imunoterapia, foi observada redução considerável da carga parasitária em todos os tecidos avaliados (baço, pele e medula óssea) no grupo de cães submetidos ao tratamento com LBMPL quando comparado ao grupo controle MPL, chegando a uma redução de 127 vezes na pele por exemplo. Estudos anteriores utilizando a imunoterapia como estratégia de tratamento na LVC demonstraram que há redução da carga parasitária nos animais pós terapêutica. Entretanto, as abordagens metodológicas investigativas utilizadas nestes trabalhos apresentavam baixa sensibilidade, como é o caso do exame microscópico corado com *Giemsa* e/ou isolamento do parasito em meio de cultura (Borja-Cabrera et a., 2004; Miret et al., 2008, Trigo et al., 2010).

Recentemente, com o avanço das técnicas moleculares, a avaliação da eficácia no tratamento imunoterapêutico vem se reforçando, com os estudos indicando e confirmando que a imunoterapia promove redução drástica do parasitismo tecidual (Santos et al., 2007; Borja-Cabrera et al., 2010; Santiago et al., 2013). Em nosso estudo, o que nos chamou atenção foi que além da redução na carga parasitária tecidual, alguns animais demonstraram negatificação da presença do DNA do parasito tanto na pele (2/9) quanto no baço (2/9) e medula óssea (3/9) após 90 dias de acompanhamento como proposto no protocolo de avaliação de nosso ensaio pré-clínico. Estes dados corroboram com resultados observados no tratamento quimioterápico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, onde a negatificação na carga parasitária tecidual foi observada (da Silva et al., 2012).

Neste contexto, este estudo avaliou o emprego da vacina terapêutica composta por antígenos totais de *L. braziliensis* associada ao adjuvante MPL (LBMPL) como proposta de tratamento para a leishmaniose visceral humana, utilizando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* e sintomático como modelo experimental. Como foi observado, cães naturalmente infectados, apresentam quadro clínico, hemato-bioquímico e imunológico

extremamente semelhantes ao da leishmaniose visceral humana. Além disso, a presença do parasito em órgãos alvos como baço e medula óssea refletem a similaridade entre os dois modelos de doença. Sendo assim, os resultados obtidos com a imunoterapia utilizando a vacina terapêutica LBMPL, como a melhora e normalização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, ativação e polarização da resposta imune preferencialmente do tipo Th1 e redução da carga parasitária, nos permitem inferir que essa estratégia de tratamento, seria válida para o emprego na leishmaniose visceral humana. Por outro lado, os resultados animadores aqui apresentados, reforçam trabalhos prévios na leishmaniose visceral canina onde a imunoterapia seria uma importante e potencial abordagem para o tratamento da doença nos cães. Dessa maneira, o risco do surgimento de cepas resistentes do parasito seria evitado bem como a redução da transmissão para o inseto vetor, e quem sabe no futuro próximo, reduzir os incontáveis cães soropositivos que são sacrificados pelo programa de controle da leishmaniose visceral no Brasil.

8. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos neste trabalho que realizou a avaliação do potencial imunoterapêutico da vacina LBMPL para a leishmaniose visceral humana, empregando o cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum* como modelo de ensaio experimental pré-clínico, nos permitiu estabelecer as seguintes considerações:

- A imunoterapia com a vacina LBMPL foi capaz de restabelecer e normalizar as principais alterações hematológicas (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas) e bioquímicas (uréia, AST ou TGO, fosfatase alcalina, bilirrubina, e proteína total) observadas na LV;
- Cães imunotratados com a vacina LBMPL demonstraram na avaliação *ex vivo*, aumento de linfócitos T CD3⁺ e suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺), redução de linfócitos B CD21⁺, redução na razão T CD4⁺/T CD8⁺, aumento da razão LT/LB, aumento de células NK CD5⁻CD16⁺ e aumento de monócitos CD14⁺ circulantes como principais biomarcadores celulares de sucesso terapêutico no sangue periférico;
- O tratamento de cães com a vacina LBMPL é indutor de memória antígeno específica, sendo capaz de induzir forte atividade linfoproliferativa frente ao estímulo específico com ASLi acompanhado por um reconhecimento preferencial de células T CD4⁺ e T CD8⁺-ASLi específicas;
- As avaliações imunológicas aplicadas ao contexto *in vitro* demonstraram que a imunoterapia com LBMPL promoveu aumento tanto de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD8⁺IFN- γ ⁺ quanto redução de linfócitos T CD4⁺ IL-4⁺ e T CD8⁺ IL-4⁺ após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), caracterizando um perfil de resistência a infecção por *Leishmania* e resposta positiva ao tratamento;
- Células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a imunoterapia com a vacina LBMPL são capazes de responder após a estimulação com ASLi, aumentando a produção/secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e

reduzindo a produção de citocinas imunomodulatórias como IL-10, citocina responsável pela patogênese da LV;

- Cães imunotratados com LBMPL apresentam redução drástica na intensidade e quantidade de sinais clínicos da LV, aumento da massa corporal além de redução da esplenomegalia, fatores intimamente associados ao sucesso terapêutico na doença humana;
- A imunoterapia com a vacina LBMPL promoveu redução da carga parasitária na medula óssea, baço e pele nos cães infectados, sendo até mesmo possível observar animais com ausência de parasitismo nestes órgãos. Estes achados, confirmam a ação efetiva da terapia vacinal contra o agente causador da LV.

Diante do conjunto de evidências acima exposto, pode-se concluir que:

- Este estudo, confirma e reafirma a indicação do cão naturalmente infectado com *L. infantum*, como modelo experimental pré-clínico de altíssimo valor na leishmaniose visceral, pois apresenta as alterações bioquímico-hematológicas, imunológicas, clínico-patológicas e parasitológicas extremamente semelhantes à LVH. Além disso, a resposta imunoterapêutica de cães é, como demonstrada neste trabalho, comparada aquela observada em avaliações humanas de fármacos convencionais ou imunofármacos na doença.
- Nossos resultados permitem também sugerir o uso da imunoterapia com a vacina terapêutica LBMPL como proposta de tratamento podendo ser utilizada combinada (imunoterapia combinada ou imunoquimioterapia) na leishmaniose visceral. Por outro lado, os resultados promissores aqui relatados, reforçam trabalhos prévios na leishmaniose visceral canina onde a imunoterapia seria uma importante ferramenta para o tratamento da doença, evitando o surgimento de cepas resistentes do parasito e reduzindo a transmissão para o inseto vetor e conseqüentemente o sacrifício de cães positivos;

- A vacina LBMPL apresenta características de um potente imunoativador da resposta imune na leishmaniose visceral. Estas qualidades apresentadas por este imunobiológico nos permitiram solicitar a sua patente que foi depositada no mês de setembro de 2013 sob o número BR1020130237680 (ANEXO 5).

9. PERSPECTIVAS

A partir da realização deste trabalho foi possível obter resultados promissores no contexto do uso da imunoterapia como estratégia de tratamento para a leishmaniose visceral, principalmente pelo uso de um modelo tão importante como o cão naturalmente infectado por *L. infantum*. Além disso, com os resultados obtidos em nosso estudo foi possível agregar novas perspectivas que contribuirão para ampliar o conhecimento sobre a imunoterapia e suas possíveis aplicações no âmbito do tratamento na LV. 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) 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);
- O possível bloqueio da transmissão do parasito para flebotomíneos e a carga parasitária nas fêmeas alimentadas (xenodiagnóstico) antes e após a imunoterapia;
- A associação da imunoterapia com a vacina LBMPL e outros imunomoduladores como anticorpos monoclonais contra o receptor de IL-10 canino (imunoterapia combinada);
- A associação da imunoterapia com a vacina LBMPL e fármacos clássicos (miltefosine, anfotericina B) e modernos (antimoniato pentavalente lipossomal, anfotericina B lipossomal) através da imunoquimioterapia.

Dessa maneira, comprovado o sucesso terapêutico da vacina LBMPL e suas possíveis combinações (imunoterapia combinada e imunoquimioterapia), torna-se altamente relevante propor a realização de um ensaio clínico com este imunobiológico para análise da eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, P, Santos-Gomes, G, Rachamim, N, Campino, L, et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 13, 537-550. 1991.

Abdelmoula, MS, et al. Visceral leishmaniasis in children: prognostic factors. *Tunis. Med.*, v. 81, p. 545-549, 2003.

Agenor, ALV, Lima-Verde, FA. et al. Renal tubular dysfunction in human visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Clin Nephrol*, v.71, n.5, May, p.492-500, 2009.

Alexander, CE, Kaye, PM, Engwerda, CR. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *L. donovani*-infected mice. *Eur. J. Immunol.* 31, 1199-1210, 2001.

Alexandre-Pires, G, de Brito, MT, Algueró, C, et al., Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 137:275-83, 2010.

Almeida RP, Brito J, Machado PL, et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Am J Trop Med Hyg*, 73: 79-81, 2005.

Alvar, J, Cañavate, C, Moreno, J, et al., Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1-87, 2004.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22: 552-557, 2006.

Alves, CF, de Amorim, IF, Moura, EP, et al. Expression of IFN-gama, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *L. (L.) chagasi*. *Vet. Immun. Immunopat.* 128, 349-58, 2009.

Amusatogui, I, Sainz, A, Rodriguez, F, Tesouro, MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol* 18: 147-156, 2003.

Alves, WA & Bevilacqua, PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saude Publica* 20: 259-265, 2004.

Andrade, HM, Toledo, VPCP, Mayrink, W, Genaro, O. Evaluation of The Immune Response and Production of Interferon in Canine Visceral Leishmaniasis. *Revue Med. Vet.* 150, 809-814, 1999.

Araújo, MS, de Andrade, RA, Sathler-Avelar, R, et al. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine*, 27 (7), 1008-17, 2009.

Araújo, MS, de Andrade, RA, Sathler-Avelar, R, et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation

vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 141, (1-2), 64-75, 2011.

Ashford, RW, Desjeux, P, deRaadt, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today*, v. 8, p. 104-105, 1992.

Badaró, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*, v. 154, p. 639-649, 1986.

Badaró R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, et al. Treatment of visceral leishmaniasis with antimony and interferon γ . *N Engl J Med*, 322: 16-21, 1990.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 175: 14-15, 2008.

Baneth, G & Shaw, SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet parasitol* 106: 315-324, 2002.

Barcellar, O, Oliveira, AD', Jerônimo, S, Carvalho, EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12, 1228–1231, 2000.

Belkaid, Y, Hoffmann, KF, Mendez, S, Kamhawi, S, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.* 194, 1497–1506, 2001.

Berman, JD. Chemotherapy for leishmaniasis – biochemical, mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

Berman JD, Hanson WL, Chapman WL, Alving CR, Lopez-Berestein G. Antileishmanial activity liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. *Antimicrobial Agents and Chem.* 30, 847-51, 1986. *J Infect Dis.* 196(4):591-8, 2007.

Bhattacharya, S, Ghosh, S, Jhonson, PL, et al. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect. Immun.* 69, 1499–1507, 2001.

Bhattacharya, SK, Sinha, PK, Sundar, S, et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 196 (4), 591-8, 2007.

Bhattacharya, P & Ali, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46 (2), 128-34, 2013.

Bogdan, C, Vodovotz, Y, Nathan, CF. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549–1555, 1991.

Boggiatto, PM, Ramer-Tait, AE, Metz, K, Kramer, EE, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin. Vaccine Immunol.*,

17, 267-73, 2010.

Borja-Cabrera, GP, Mendes, AC, de Souza, EP et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, 22, 2234-43, 2004.

Borja-Cabrera, GP, Santos, FN, Santos, FB, et al. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. v. 28, p. 597-603, 2010.

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

Braga, S. L. (2011). Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados - Uma busca racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia) Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Brandonisio, O, Panaro, MA, Sisto, M, et al. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia*. 43 Suppl 1:1-6, 2001.

Bretagne, S, Durand, R, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.8, n.4, Jul, p.828-31, 2001.

Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis*. 179(6):1485-94, 1999.

Caldas, A, Favali, C, Aquino, D, et al. Balance of IL-10 and IFN- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Inf. Dis*. 5, 113, 1-9, 2005.

Cardoso, L, Neto, F, Sousa, JC, et al. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol*. 79, 213-20, 1998.

Carrillo, E, Ahmed, S, Goldsmith-Pestana, K, et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 25, 1534-43, 2007.

Carrillo, E & Moreno, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immun. Immunopat*. 128, 67-60, 2009.

Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD Jr. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*. 33(2):498-500, 1981.

Cenini, P, Berhe, N, Hailu, A, McGinnes, K, Frommel, D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J. Infect. Dis*. 168, 986-993, 1993.

Chamizo, C, Moreno, J, Alvar, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67-75, 2005.

Ciaramella, P, Oliva, G. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, v.141, n.21, Nov 22, p.539-43, 1997.

Cikos, S, Bukovska, A, Koppel, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 8: 113, 2007.

Clementi, A, Battaglia, G. et al. Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. *NDT Plus*, v.4, p.147-152, 2011.

Collin, S, Davidson, R, Ritmeijer, K, Keus, K, et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin. Infect. Diseases*, [S.l.], v. 38, p. 612-619, 2004.

Collin, SM, et al. Unseen Kala-azar deaths in south Sudan (1999-2002). *Trop Med Int Health*, v.11, n.4, Apr, p.509-12. 2006.

Convit, J, Castellano, PL, Rondon, A, Penardi, ME, Ulrich, M, Castes, M, Bloom, B, Garcia, L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet*. 1: 401-404, 1987.

Convit, J, Ulrich, M, Zerpa, O, Borges, R, Aranzazu, N, et al. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 97: 469-72, 2003.

Cortese, L, Pelagalli, A, Piantedos, D. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53: 546-548, 2006.

Costa CH, Pereira HF, Pereira FC, Tavares JP, Araújo MV, Gonçalves MJ. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93(5):464, 1999.

Costa, CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 2959-2963, 2008.

Costa, DL. (2009) Fatores de Prognóstico na Leishmaniose Visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte. Belo horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorado em Ciências da Saúde.

Costa, DL, Rocha, RL, Carvalho, RMA, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and Global Health*, 107 (2), 78-87, 2013.

Croft, SL, Snowdon, D, Yardley, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and

Trypanosoma brucei. J Antimicrob Chemother, v.38, n.6, p.1041-7, 1996.

Croft, SL, Sundar, S, Fairlamb, AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev. Review, v.19, 111-26. 2006.

Da Costa-Val AP. (2004). Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Da Costa-Val, AP, Cavalcanti, RR, Gontijo, NF, Michalick, MMS, et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet J 174: 636-643, 2007.

Da Silva, SM, Rabelo, PF, Gontijo, NF, Ribeiro, RR, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Vet Parasitol 174: 150-154, 2010.

Da Silva. (2011) Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina. Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 243 p, Doutorado em Parasitologia.

Da Silva, SM, Amorim, IFG, Ribeiro, RR, et al. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. Ant. Ag. Chem. 56, 2858-67, 2012.

Darrah, PA, Patel, DT, de Luca, PM, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. Nature medicine, v. 13, n. 7, p. 843-50, 2007.

Day, MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. Vet. Parasitol. 147, 2-8, 2007.

De Luna, R, Vuotto, ML, Ielpo, MT, et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 70, 95-103, 1999.

De Queiroz, NM, da Silveira, RC, de Noronha, AC Jr, et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol, v.178, n.1-2, May 31, p.1-8, 2011.

Deane, L. M., Deane, M. P. (1955). Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. Hospital. 47, 75-87.

Deane, L. M. (1961). [Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil.]. Rev. Assoc. Med. Bras. 7, 161-169.

Deplazes, P, Smith, NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol, v.17, n.9, Sep, p.451-8, 1995.

- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318, 2004.
- Ding, AH, Nathan, CF, Stuber, DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2411, 1988.
- Drumond, KO, Costa, FA. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.53, n.1, p.3-11, 2011.
- Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Parasitol Res*, v.96, n.4, Jun, p.216-23. 2005.
- Dubovsky P. Vaccinotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Trop Dis Bull*, 40: 297, 1943.
- Dutra, M, Martinelli, R. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis*, v.6, n.1, Jul, p.22-7, 1985.
- Elkhoury, ANSM. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniose visceral en las Américas, Brasília, pp. 24-26, 2005.
- Elkhoury, A, Sousa, M, Lucena, F, Alves, W, Sena, J, Paz, L. Co-infecção leishmaniose visceral e AIDS no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 124, 2007.
- Feitosa, MMI, Luvizotto, FA, et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo., v.5, p.36-44, 2000.
- Firooz A, Khamesipour A, Ghoorchi MH, et al. Imiquimod in combination with meglumine antimonite for cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol*, 142: 1575-9, 2006.
- Gallis, HA, Drew, RH, Pickard, WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Review of Infectious Diseases*, 12, 308-29, 1990.
- Francino, O, Altet, L, Sanchez-Robert, E, Rodriguez A, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137: 214-221, 2006.
- Freitas, JCC, Nunes-Pinheiro, DCS, Neto, BEL. Clinical and laboratory alterations in dogs infected by *L. chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 45 (1): 24-29, 2012.
- Gassim, S, El-Hassan, AM, Khalil, EAG, Ismail, A, Kadarn, MY, Kharazmi, A, et al., High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 64–69, 1998.
- Gautam, S, Kumar, R, Maurya, R, Nylén, S, Ansari, N, Rai, M, Sundar, S, Sacks, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 204:1134-7, 2011.

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

Ghalib, HW, Piuvezam, MR, Skeily, YA. W., Siddig, M., Hasim, FA, El-Hassan, AM, Russo, DM, Reed, SG. Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infection. *J. Clin. Investig.* 92, 324–329, 1993.

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, RC, Mayrink, W, Genaro, O, et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp Pathol.* 135, 100-107, 2006.

Giunchetti, RC, Correa-Oliveira, R, Martins-Filho, O, et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25, 7674-7686. 2007.

Giunchetti, (2007). Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Ciências). Ouro Preto: Instituto de Ciências Biológicas/Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 203p.

Giunchetti, RC, Correa-Oliveira, R, Martins-Filho, O, et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26, 623-638. 2008a.

Giunchetti, RC, Mayrink, W, Carneiro, CM, et al. 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, 2008b.

Guerra, LL, Teixeira-Carvalho, A, Giunchetti, RC, et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 104, 611-22, 2009.

Hailu, A, van Baarle, D, Knol, GJ, et al. 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. 2005.

Harms, G, Pedrosa, C, Omena, S. Natural killer cell activity in visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 54-55. 1991.

Herwaldt B.L. Leishmaniasis. *Lancet. Review.* v. 354, p. 1191-9. 1999.

Jha, TK, Sundar, S, et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral

leishmaniasis. N Engl J Med, v.341, n.24, p.1795-800. 1999.

Hoeprich, PD. Clinical use de amphotericin B and devivatives: Lore, mystique and fact. Clin Infect Dis, v. 14, n. 1, p. 114-119, 1992.

Jamshidi, S, Avizeh, R, Moheballi, M, Bokaie, S. Immunotherapy using autoclaved *L. major* antigens and *M. vaccae* with meglumine antimoniate, for the treatment of experimental canine visceral leishmaniasis. Iran. J. Parasitol., Vol. 6, n. 2, p. 26-34, 2011.

Karp, CL, El-Safi, SH, Wynn, TA, et al. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. J. Clin. Investig. 91, 1644–1648, 1993.

Kemp, M, Kurtzhals, JA, Kharazmi, A, Theander, TG. Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. Immunol Cell Biol. 71, 583-7, 1993.

Kotwal, J, Batra, VV, Saxena, R, et al. Hematological changes in visceral leishmaniasis. J Assoc Physicians India, v. 48, n. 3, p. 363-4, 2000.

Lainson, R, and Shaw, JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. Nature 273:595-600, 1978.

Lage, RS, Oliveira, GC, Busek, SU, Guerra, LL, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Vet. Immunol. Immunopathol. 115, 135-145. 2007.

Lagler, H, Willheim, M, Traunmüller, F, et al. 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, 2002.

Le Fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B, Ruelle S, Lelièvre A, Grousseau D, Kubar J. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. Antimicrob Agents Chemother, v.42, n.3, p.654-8. 1998.

Liew, FY & O'Donnell, CA. Immunology of leishmaniasis. Adv. Parasitol. 32, 161-259, 1993.

Lima, VMF, Peiro, JR, Vasconcelos, RO. IL-6 e TNF-a production during active canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 115, 189-193, 2007.

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.

Lukes, J, Mauricio, IL. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.22, May, p.9375-80, 2007.

Machado-Pinto, J, Pinto, J, da Costa, CA, Genaro, O, et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania* (*Leishmania*)

amazonensis vaccine plus antimonial. Int. J. Dermatol. 41: 73-78, 2002.

Maia-Elkhoury, AN, Carmo, EH, Sousa-Gomes, ML, Mota, E. Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method. Rev Saude Publica 41: 931-937, 2007.

Maia, C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Trop, v.116, n.3, Dec, p.193-9, 2010.

Maia, C, & Campino, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *L. infantum* infection in the dog. J. Trop. Med. 12, 541571, 7, 2012.

Mancianti, F., Grammiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82, 566-567, 1988.

Manna, L, Reale, S, et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. Vet Parasitol, v.142, n.3-4, p.271-80, 2006.

Manna, L, Reale, S, Vitale, F, et al. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet J. 177: 279-282, 2008.

Manna, L, Vitale, F, Reale, S, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. The Vet. J. 182: 441-45, 2009.

Mayrink, W, Magalhães, PA, Michalik, MSM, Da Costa, CA, et al. Immunotherapy as a treatment of american cutaneous leishmaniasis: preliminar studies in Brasil. Parassitologia. 34: 159-165, 1992.

Mayrink, W, Botelho, ACC, Magalhães, PA, Batista, SM, et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for american cutaneous leishmaniasis treatment. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 39(1): 14-21, 2006.

Mcmahon-Pratt, D, Alexandre, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? Immunol Rev, v.201, Oct, p.206-24, 2004.

Meyerhoff, A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin. Inf. Diseases, v. 28, p. 42-48, 1998.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p. 2006a.

Ministério da Saúde. Manual de leishmaniose visceral grave – normas e condutas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 62p. 2006b.

Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o diagnóstico, tratamento e

acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 112p, 2011.

Ministério da Saúde. Novo protocolo de tratamento da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 21p, 2013.

Miralles, GD, Stoeckle, MY, McDermott, DF, Finkelman, FD, Murray, HW. Induction of Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62, 1058–1063, 1994.

Miret J, Nascimento E, Sampaio W, França JC, Fujiwara RT, et al., Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* v. 26, p. 1585-94, 2008.

Miro, G, Galvez, R, Fraile, C, Descalzo, MA, Molina, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors* 4: 52, 2011.

Mishra, P, et al. Disseminated intravascular coagulation as an unusual presentation of Kala-azar: report of two cases. *Scand J Infect Dis*, v.36, n.6-7, p.519-21. 2004.

Modi, GB, Tesh, RB. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol* 20: 568-569, 1983.

Moore, KW, de Waal Malefyt, R, Coffman, RL, O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765, 2001.

Monteiro, SP, Lacerda, MM, Arias, JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev.Soc. Bras.Med. Trop.*, v. 27, p. 67-72, 1994.

Moreira, N. D. (2012). História natural da leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de *Leishmania infantum* com perfis distintos de virulência e patogenicidade (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas) Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Moreira Nd, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM, et al. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: "Leishman Donovan Units" versus Real-Time PCR. *PLoS One.* 7(10):e47907, 2012.

Moreno, J, Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, 18, 399-405. 2002.

Murray, HW, Montelibano C, Peterson R, Sypek JP. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.182, n.5, p.1497-502. 2000.

Murray, HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral

Leishmaniasis. *Antim. Agents and Chem.* 45, 2185-97, 2001.

Murray, HW, Lu, CM, Mauze, S, Freeman, S, Moreira, AL, Kaplan, G, Coffman, RT. Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.* 70, 6284-6293, 2002.

Musa, AM, Noazin, S, Khalil, EA, Modabber, F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 104:1-2, 2010 Review.

Nasir, AM, Al-Nasser, MN, et al. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr (Rio J)*, v.41, p.143-8, 1995.

Nieto, CG; Navarrete, I. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, v.45, n.1-2, Dec, p.33-47, 1992.

Noli, C, & Auxilia, ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 16: 213-232, 2005.

Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res*, v.42, n.1, p.39, 2011.

Nylén S, Sacks, DL. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 28, 378-84. Review. 2007.

Okwor, I & Uzonna, JE. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. *Immunotherapy*, v. 1, n. 5, p. 765–76, 2009.

Oldham, RK. *Principles of Cancer Biotherapy* . Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, (2006).

Oliveira, MC, Amorim, RFB, Freitas, RA, Costa, ALL. Óbito em caso de leishmaniose cutâneomucosa após o uso de antimônio pentavalente. *Parasitol*, v.46, p.231-234. 2004.

Oliveira, AL, et al. [Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.39, n.5, Sep-Oct, p.446-50. 2006.

Oliveira, JM, Fernandes, AN, et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, p.188-193, 2010.

Palatnik-de-Sousa, CB, dos Santos, WR, Franca-Silva, JC, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 510-517, 2001.

Panaro, MA, Brandonisio, O, Cianciulli, A, et al., Cytokine expression in dogs with natural *L. infantum* infection. *Parasitology*, 136, 823-31, 2009.

Pastorino, AC, et al. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. J Pediatr (Rio J), v.78, n.2, Mar-Apr, p.120-7. 2002.

Peine, KJ, Gupta, G, Brackman, DJ, et al. Liposomal resiquimod for the treatment of *L. donovani* infection. J. Antimicrob. Chemother. doi: 10.1093/jac/dkt320, 2013.

Pereira, LIA, Dorta, ML, Pereira, AJCS, et al. Case report: Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81 (3), 378-83, 2009.

Peruhype-Magalhães, V, Martins-Filho, OA, Prata, A, et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. Scan. J. Immun. 62, 487-95, 2005.

Pinelli, E, Killick-Kendrick, R, Wagenaar, J, Bernadina, W, del, RG, Ruitenber, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun. 62, 229-235, 1994a.

Pinelli, E, Boog, CJ, Rutten, VP, van, DB, Bernadina, WE, Ruitenber, EJ. A canine CD8⁺ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum* infected macrophages. Tissue Antigens. 43, 189-192, 1994b.

Pinelli, E, Gonzalo, RM, Boog, CJ, Rutten, VP, Gebhard, D, del, RG, Ruitenber, EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur. J. Immunol. 25, 1594-1600, 1995.

Pinelli, E. Cytokines in canine visceral leishmaniasis, Cytokines in veterinary medicine. Ed. by H.M. Schijns VECJ, pp. 217-247, 1997. Netherlands: Utrecht University.

Pinelli, E, van der Kaaij, SY, Broeren, CP, Ruitenber, EJ, Rutten, VP. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. Immunogenetics. 49, 696-9, 1999.

Plevraki, K, Koutinas, AF. et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). J Vet Intern Med, v.20, n.2, Mar-Apr, p.228-33, 2006.

Prajeeth, CK, Haerberlein, S, Sebald, H. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines, but not of NK cell cytotoxicity. Infect. Immun. 79, 2699-2708, 2011.

Prata, AR. Treatment of kala-azar with amphotericin B. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 57, p. 266-268, 1963.

Queiroz, MJ, et al. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. J Pediatr (Rio J), v.80, n.2, Mar-Apr, p.141-6. 2004.

Quinnell, RJ, Courtenay, O, Shaw, MA, et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421-1424, 2001.

Quinnell, RJ, Courtenay, O, Shaw, MA, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infet. Di.* 183, 1421-24 (2001).

Raskin KB, Beldner S. Clinical examination of the distal ulna and surrounding structures. *Hand Clin* 14: 177-190, 1998.

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

Reis, AB, Teixeira-Carvalho, A, Vale, AM, Marques, MJ, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* v.112, p. 102–116; 2006a.

Reis, AB, Martins-Filho, OA, Teixeira-Carvalho, A, Carvalho, MG, Mayrink, W, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68-75, 2006b.

Reis, AB, Teixeira-Carvalho, A, Giunchetti, RC, Guerra, LL, et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 303-311, 2006c.

Reis AB, Martins-Filho, OA, Teixeira-Carvalho, A, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87-95. Review. 2009.

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

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol* 18: 289-290, 2002b.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2564-2572, 2008.

Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, et al. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *PLoS ONE* 7(11): e49780, 2012.

Roberts, WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). *Antimicrob. Agents*

Chemother. 42, 1076–1082, 1998.

Rodríguez-Cortés, A, Fernández-Bellón, H, Ramis, A, Ferrer, L, et al. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 190-8. 2007.

Romero, GA, Boelaert, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e584, 2010.

Row R. Curative value of *Leishmania* culture vaccine in oriental sore. *Br Med J*, 9: 540–541, 1912.

Rougier, S, Hasseine, L, Delaunay, P, et al. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet. Par.* 186: 245-53, 2012.

Ruitenber, EJ, Solano-Gallego, L, Monen, J, Pinelli, E, Rutten, VPMG. Immune responses in canine leishmaniasis. *Sumaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Greece*, 32-36, 2001.

Sacks, D, & Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *L. major* mice. *Net. Rev. Immunol.* 2, 845-858, 2002.

Salomón, OD, & Orellano, PW. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100, 475-6, 2005.

Salomón, O, Sinagra, A, Nevot, M, Barberian, G, Paulin, P, Estevez, J, Riarte, A, Estevez, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103, 109-11, 2008.

Salomón, OD, Quintana, MG, Bruno, MR, Quiriconi, RV, Cabral, V. Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 801-4, 2009.

Santiago, MEB, Neto, LS, Alexandre, EC, et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica.* 127, 174-180, 2013.

Santos, FN, Borja-Cabrera, GP, Miyashiro, LM, et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine.* v. 25, p. 6176-90, 2007.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CH. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 629-633, 2002.

Santos-Gomes, GM, Rosa, R, Leandro, C, Cortes, S, Romão, P, Silveira, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 88, 21-30, 2002.

Santos-Gomes, GM, Capela, MJ, Ramada, J, Campino, L. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 87, 235-44. 2003.

Schiller, JT, Castellsague, X, Villa, LL, Hildesheim, A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10: K53-61, 2008.

Seaman, J, et al. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med.* v.124, n.7, Apr 1, p.664-72. 1996.

Seder, RA, Darrah, PA, Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 8 (6), 486, 2008.

Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* v.193, n.4, p.173-80, 2004.

Singh, K, et al. Clinical and laboratory study of kala-azar in children in Nepal. *J Trop Pediatr.* v.45, n.2, Apr, p.95-7. 1999.

Solano-Gallego, L, Llull, J, Ramos, G, et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37-45, 2000.

Solano-Gallego, L, Koutinas, A, Miro, G, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165: 1-18, 2009.

Solano-Gallego, L, Miro, G, Koutinas, A, Cardoso, L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 4: 86, 2011.

Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* v.72, n.4, Apr, p.421-2. 2005.

Souza, GF, Biscione, F, Greco, DB, Rabello, A. Slow clinical improvement after treatment initiation in *Leishmania*/HIV coinfecting patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45 (2): 147-50, 2012.

Squires, KE, Rosenkaimer, F, Sherwood, JA, Forni, AL, Were, JB, Murray, HW. Immunochemotherapy of visceral leishmaniasis: a controlled pilot trial of antimony versus antimony plus interferon gama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48; 666-9, 1993.

Starkey, MP, Scase, TJ, Mellersh, CS, Murphy, S. Dogs really are man's best friend - canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 4, 112-128, 2005.

- Sundar, S, Rosenkaimer, F, Lesser, ML, Murray, HW. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 171(4):992-6, 1995.
- Sundar, S, Singh, VP, Sharma, S, Makharia, MK, Murray, HW. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 176(4):1117-9, 1997.
- Sundar, S, Rosenkaimer, F, Makharia, MK, Goyal, AK, et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.* v. 352, p. 1821-3, 1998.
- Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 6:849-854, 2001.
- Sundar, S, Mehta, H, Suresh, AV, Singh, SP, Rai, M, Murray, HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis.* 38(3):377-83, 2004.
- Sundar, S, Chatterjee, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* 123, 345-52, 2006.
- Sundar, S, Chakravarty, J, Rai, VK, Agrawal, N, et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. *Clin Infect Dis.* 45, 556-61, 2007.
- Sundar, S, Rai, M, Chakravarty, J, Agrawal, D, et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis.* 47, 1000-6, 2008.
- Sundar, S, Chakravarty, J, Agrawal, D, Rai, M, Murray, HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 362, 504-12, 2010.
- Tesh, RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg.* v.52, p.287-92, 1995.
- Thakur, CP. et al. Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibogluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. *Indian J Med Res.* v. 97, p. 170-175, 1993.
- Thakur, CP, Narayan, S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* v. 98, n. 2, p. 129-138, 2004.
- Tong, NK, Beran, J, Kee, SA, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney international* 68(5): 2298-2303, 2005.
- Trópia de Abreu R, Carvalho, Md, Carneiro, CM, Giunchetti, RC, et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One.* 6 (5): e18873, 2011.

Unger, C, Damenz, W, Fler, EA, Kim, DJ, et al. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol*, v.28, n.2, p.213-7, 1989.

Vacchelli, E, Galluzzi, L, Eggermont, A, et al. FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *OncoImmunology* 1: 6, 894-907, 2012.

Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 26(3):78-82, 2010.

White, ACJr, Castes, L, Garcia, D, et al. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 123-31, 1992.

Werneck, GL, et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*, p.174-177, 2003.

World Health Organization - WHO. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series. v. 739, 1990.

World Health Organization - WHO. Report on the consultative meeting on leishmaniasis/HIV co-infection. WHO/LEISH95.35, 1995.

World Health Organization - WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184, 2010.

11. ANEXOS

Anexo 1



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. 106/2010, de 10 de novembro de 2010.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

DEACL/EF/UFOP

Senhor Pesquisador,

É com prazer que enviamos o certificado de aprovação do protocolo relativo ao uso de animais do seu projeto intitulado "*Desenvolvimento de estratégias e soluções inovadoras aplicadas a ensaios pré clínicos na terapêutica da Leishmaniose visceral*". 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,

Prof. Dra. Maria Lúcia Pedrosa

Coordenadora da CEUA/UFOP.

Anexo 2



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Desenvolvimento de Estratégias e Soluções Inovadoras Aplicadas a Ensaios Pré Clínicos na

Terapêutica da Leishmaniose Visceral”

Informação ao Proprietário

Recentemente os agentes de zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde/Controle de Zoonoses de Governador Valadares, fizeram coleta de sangue em seu cão para exame de leishmaniose. Após a realização do exame seu animal apresentou resultado positivo. Segundo o Ministério da Saúde, cães positivos representam risco à saúde pública e por este motivo devem ser eutanasiados. A Universidade Federal de Ouro Preto vem trabalhando na busca de novas formas de tratamento para a leishmaniose visceral humana, e para que possamos realizar este estudo necessitamos de cães infectados. Sendo assim solicitamos que você nos doe seu cão doente, após recolhimento pelo serviço de zoonoses da Prefeitura. Esta atitude nos possibilitará testar novas formas de tratamento para leishmaniose visceral humana. O animal receberá tratamento por um período de aproximadamente seis meses no Canil de Experimentação da Universidade Federal de Ouro Preto e após este tempo será eutanasiado conforme normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Universidade. Este trabalho está sendo desenvolvido em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares.

Ninguém poderá obrigá-lo a participar do estudo, mas contamos com a sua colaboração já que o desenvolvimento de novos tratamentos é de grande importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral. O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Você poderá fazer quantas perguntas quiser, sendo um prazer para nós respondê-las. É importante ressaltar que o senhor (a) tem a completa liberdade de recusar a doar seu cão. Se você estiver de acordo em contribuir com o desenvolvimento desta pesquisa, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo. Desde já agradecemos a sua participação.

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Governador Valadares, ____/____/2011

✂-----

“Desenvolvimento de Estratégias e Soluções Inovadoras Aplicadas a Ensaios Pré Clínicos na

Terapêutica da Leishmaniose Visceral”

Este trabalho faz parte do doutorado em Ciências Biológicas do aluno Bruno Mendes Roatt, área de concentração, Imunobiologia de Protozoários, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP orientado pelo Professor Alexandre Barbosa Reis.

Para qualquer informação sobre o estudo entre em contato conosco:

Bruno Mendes Roatt e/ou Alexandre B. Reis: fone: (31) 3559-1694 ou (31) 3559-1036;

Endereço: Instituto de Ciências Biológicas – ICEBII – Laboratório de Imunopatologia sl 40 Campus Morro do Cruzeiro – Ouro Preto/MG.

Correio eletrônico: roatt@nupeb.ufop.br / bmroatt@gmail.com

Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP – CEUA/UFOP:

Endereço: Universidade Federal de Ouro Preto - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP)

ICEB II, Campus Universitário – Morro do Cruzeiro 35400-000 – Ouro Preto (MG) – Brasil

Tel.: (31) 3559-1367/1368

Anexo 3



Universidade Federal de Ouro Preto

Ficha de Identificação e Controle de Cães Projeto Doutorado Bruno Roatt

Laboratório de Imunopatologia - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Tel. 31 – 3559 1694

Classificação Clínica dos Cães - Identificação

Cão: Leão Nº: V13 Baia: 07 Data: 23 /09 / 2011
 Sexo: Macho (X) Fêmea () Raça: SRD Pelagem: Curta
 Porte: (X) Pequeno () Médio () Grande; Peso: _____ Kg; Idade: _____
 Procedência: Gov. Valadares
 Diagnóstico: Sorológico RIFI/ELISA (+) Parasitológico _____
 Vacinado contra LVC: () Sim (X) Não Tratamento para LVC: () Sim (X) Não



Características:

- A) Cor da pelagem: Marrom
 B) Tamanho: Pequeno
 C) Peculiaridades (marca de nascença, defeito físico etc...): Pêlo marrom com mancha branca abaixo do queixo – LEÃO.

Anexo 4

FICHA PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA - CÃES DOUTORADO BRUNO ROATT

Cão: _____ Sexo: M () F () Avaliação: _____ T °C: _____ Data: ___/___/___

Sinais Clínicos	0	1	2	3
Apetite:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Reduzido		<input type="checkbox"/> Anorexia
Peso _____Kg:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Perda leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
Comportamento:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Apatia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Prostração
Músculo Temporal:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Atrofia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
Musculatura Geral:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Atrofia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Caquexia
Adenopatia:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> 1 a 2 linf.	<input type="checkbox"/> + de 2 linf.	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Linfonodos Subm.: 1 <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/> ; Pré esc.: 1 <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/> ; Poplíteos: 1 <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/>				
Conjuntivite:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Unilat./moderada	<input type="checkbox"/> Bilat./severa uni.	<input type="checkbox"/> Bilat./sev.
Ceratite:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Unilat./moderada	<input type="checkbox"/> Bilat./severa uni.	<input type="checkbox"/> Bilat./sev.
Mucosa oral:	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anemia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
Úlceras/nódulos orais:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> 1 a 2 ulc./nod.	<input type="checkbox"/> + de 2 ulc./nod.	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Diarréia:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Ocasional	<input type="checkbox"/> Frequente	<input type="checkbox"/> Sangram.
Artrite:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> até 2 patas	<input type="checkbox"/> +2 patas
Eritema na pele:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> >10% ou leve	<input type="checkbox"/> 10-25% ou mod.	<input type="checkbox"/> <25%
Úlceras/Nódulos:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> 1 a 2 ulc./nod.	<input type="checkbox"/> + de 2 ulc./nod.	<input type="checkbox"/> +5 ulc/nod
Alopecia:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> >10% ou leve	<input type="checkbox"/> 10-25% ou mod.	<input type="checkbox"/> <25%
Des/hiperpigment.:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Dermatite seborréica:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Dermatite furfurácea:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Hiperkerat. foc./pata:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Generaliz.
Onicogribose:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
Vasculite:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Localizada/leve	<input type="checkbox"/> Multifocal/mod.	<input type="checkbox"/> Gen./sev.
Esplenomegalia:	<input type="checkbox"/> Ausência	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Import.
Epila facilmente:	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim		
Observações: _____				

Anexo 5 - Continuação

ANEXO DE DADOS

Título da Invenção: “Vacina Terapêutica na Imunoterapia da Leishmaniose Visceral Humana e/ou Canina”

Continuação do Item 01 – Depositantes

- 1.1 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
1.2 CNPJ: 21.949.888/0001-83
1.3 Endereço: Rua Raul Pompéia, 101, Bairro São Pedro, Belo Horizonte/MG.
1.4 CEP: 30.330-080 1.5 Telefone: 31 3280-2161
1.5 Email: dtt@fapemig.br

Continuação do Item 01 – Inventores

- 6.1 Nome: Bruno Mendes Roatt Dep. Lab.: Laboratório de Imunopatologia - UFOP
6.2 Qualificação: Doutorando 6.3 CPF: 058.595.346-55
6.4 Endereço completo: Rua Vítório Zanetti, nº306, apto 102, Bairro lagoa, Ouro Preto-MG.
6.5 CEP: 35400-000 6.6 Telefone: (31) 3559-1694
6.7 Email: bmroatt@gmail.com
- 6.1 Nome: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares Dep. Lab.: Laboratório de Imunopatologia - UFOP
6.2 Qualificação: Doutorando 6.3 CPF: 067.214.226-03
6.4 Endereço completo: Rua Rio das Velhas, 929, casa A, Bairro Morro São Sebastião, Ouro Preto, MG.
6.5 CEP: 35400-000 6.6 Telefone: (31) 3559-1694
6.7 Email: rodrigodian@gmail.com
- 6.1 Nome: Rodolfo Cordeiro Guinchetti Dep. Lab.: Laboratório de Imunopatologia - UFOP
6.2 Qualificação: Professor 6.3 CPF: 277.054.508-60
6.4 Endereço completo: Rua Geraldo Magela de Almeida, 270, apto 301, Bairro castelo, Belo Horizonte-MG
6.5 CEP: 30840-640 6.6 Telefone: (31) 3559-1694
6.7 Email: giunchetti@nupeb.ufop.br