

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Lays Adrienne Mendonça Trajano Silva

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES FRENTE A
NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum***

RECIFE

2017

LAYS ADRIANNE MENDONÇA TRAJANO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES FRENTE A
NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr.^a Milena de Paiva Cavalcanti

Coorientadora: Dr.^a Virginia Maria Barros de Lorena

RECIFE

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- S586c Silva, Lays Adrienne Mendonça Trajano.
Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum* / Lays Adrienne Mendonça Trajano Silva. - Recife: [s.n.], 2017.
85 p. : il., graf., tab., mapas, 30 cm.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.
Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti.
Coorientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.
1. Leishmaniose Visceral - imunologia. 2. *Leishmania infantum*. 3. Cães. 4. Antígenos de Protozoários. 5. Proteínas recombinantes. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

LAYS ADRIANNE MENDONÇA TRAJANO SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES FRENTE
A NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de Aprovação: 20/10/2017

Banca Examinadora

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Dept^o de Microbiologia

Dr^o Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Dept^o de Microbiologia

Dr^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco

A minha família e todos que amo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permitiu a realização desse sonho e guiou todos os meus passos até aqui.

Aos meus pais, minha base, meu alicerce, João Maria Trajano e Paula Adriana Mendonça, por todo o apoio, por sonharem junto comigo, pelas palavras de incentivo e por acreditarem que a educação é o maior legado que se pode deixar para os filhos. A vocês toda minha gratidão.

Aos meus avós, Edneide Mendonça (*In Memoriam*) e Edgar Costa (*In Memoriam*), que sempre acreditaram em mim, e que com toda certeza de algum lugar estão felizes por mais essa conquista, a eles a minha imensa saudade.

A minha irmã Luana Trajano, pelo carinho de sempre, por todos companheirismo, incentivo e amor. Muito obrigada por estar sempre comigo.

Ao meu Tio Eduardo Romero, gostaria de poder transmitir em palavras a importância do senhor na minha vida. Me acolheu, incentivou, aconselhou, protegeu e sempre acreditou em mim. Toda gratidão por tudo tio.

Ao meu noivo, Paulo Henrique Cavalcanti, por todo companheirismo dentro e fora da vida acadêmica, por sua paciência e tranquilidade em momentos que me vi perdida entre tantas escolhas, suas palavras de incentivo e conselhos, por sonhar junto comigo ao longo dessa caminhada e por todo amor. Ainda teremos muitos obstáculos, mas sei que juntos conseguiremos contornar as dificuldades e comemorar cada nova conquista alcançada. Agradeço também a, Rosimere Cavalcanti, Paulo Gomes, Pedro Henrique e Bianca Nunes por me acolherem em sua casa, vocês são minha segunda família.

À minha orientadora Milena Paiva, por contribuir para o meu amadurecimento, crescimento profissional e por toda confiança depositada. Posso afirmar com toda certeza que tenho uma mãe científica, não apenas uma orientadora, e mesmo que nossos caminhos se distanciem ou tracem outras rotas, eu sempre vou lembrar de onde vim e de todos os ensinamentos adquiridos. Serei sempre grata por tudo.

À minha Co-orientadora Virgínia Lorena, por contribuir com a minha formação, toda disponibilidade em transmitir seu conhecimento e por toda a amizade construída ao longo dessa caminhada.

Aos companheiros de equipe Suênia Albuquerque, Rômulo Pessoa, Rayana Morais, Gilsan Oliveira, Tayná Correia, Cíntia Nascimento e Victor Souza, por me ensinarem o verdadeiro valor de uma equipe, por todas as conversas, conselhos e pela ajuda nos experimentos em momentos de aperto.

Aos amigos que a biomedicina me deu, Leyllane Moreira, Vinicius Jackes, Wadja Guimarães, João Ferreira, Mel Borba, Renato Pessoa e Flávia Albuquerque. Mesmo com os caminhos traçando rotas diferentes a nossa amizade permaneceu e de alguma forma estamos sempre torcendo um pelo outro. Vocês são muito importantes para mim.

Aos amigos que ganhei e que hoje posso chamar de meus também, Lili Guedes, Igor Guaraná, Erwelly Barros, Débora Lubambo e Maryana Dias, por todos os momentos de descontração, pelo apoio e por não me deixarem sozinha nos momentos em que a saudade do noivo apertava.

Aos Amigos distantes, Ellen Lyra, Thalita Mesquita, Aryanne Oliveira, Yoná Micaella, por cada mensagem de apoio e por sempre demonstrarem aquele carinho por mim.

Aos amigos que a USP me deu, Denyse Lago, Camila Gachet e Bruno Marcel, por todas as conversas científicas ou não, por momentos de descontração, conselhos e por cada palavra de incentivo durante essa caminhada de pós-graduação.

A todos da turma de mestrado de 2016.1 em especial Michelle Barros, Rodrigo Loyo, João Pitta, Túlio Wanderley, Larissa Maciel e Crhisllane Vasconcelos por trilhar comigo essa caminhada, chorando e sorrindo com cada disciplina finalizada, pelos momentos de descontração e pela companhia nos almoços de todo dia. Quero vocês para sempre na minha vida.

A todos do Laboratório de Biologia celular de patógenos, a Dr^a Regina Bressan e Dr Antonio Pereira, pela acolhida e pela troca de experiências, foi de um enorme crescimento.

Agradeço por fim:

Ao IAM – FIOCRUZ/PE por permitir o uso de suas instalações físicas.

A todos que fazem parte do Departamento de Microbiologia do IAM – FIOCRUZ/PE por todas as discussões científicas, em especial ao Dr. Osvaldo Pompilio e ao Grupo de Pesquisas

de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, por reconhecer as necessidades do trabalho e colocar à disposição as ferramentas para a sua realização.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN/PE) e ao centro de zoonoses (CCZ) de Caruaru pelo fornecimento de amostras para a realização deste trabalho.

A todos os cães que sofrem com Leishmaniose Visceral, em especial aos que participaram desse estudo. Esse agradecimento vem somado ao desejo de que mais pesquisas como estas sejam realizadas, e que o sucesso dessas leve a redução da eutanásia, promovendo mais qualidade de vida a esses animais, com tratamento e métodos de prevenção eficazes.

A FACEPE, pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos, concedido através bolsa de pós-graduação.

SILVA, Lays Adrienne Mendonça Trajano. **Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum***. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

A resposta imune na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é importante para o controle e a cura da infecção. Dentro desse contexto, proteínas que estimulam um perfil do tipo Th1, tem sido explorada como candidatos vacinais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune celular de cães frente a novas proteínas recombinantes, para obtenção de subsídios científicos que direcionem estudos de vacinologia. Para isto amostras de sangue de cães com LV residentes em área endêmica em Pernambuco foram coletadas. Um estudo piloto foi realizado para escolha dos estímulos *in vitro*, bem como concentrações antigênicas e tempo de cultivo. Após separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), as células foram submetidas ao estímulo com antígenos Lci10, Lci13 e a proteína quimérica Q1 nas concentrações de 2,5µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL, e antígeno bruto solúvel de *L. infantum* (LSA) nas concentrações de 10µg/mL e 25µg/mL por 24h, 48h e 72h. Ao fim do tempo de cultivo o RNA total foi extraído e uma transcrição reversa para cDNA foi realizada para avaliação da expressão gênica para as citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β através do método de *Ct* comparativo por RT-PCR em tempo real. Para o LSA a concentração de 25µg/mL foi escolhida, por apresentar uma melhor expressão das citocinas tanto do perfil Th1, quanto Th2. O PBMC que foi estimulado com a Lci13 (5µg/mL em 24h de cultivo), apresentou um perfil protetor (Th1) quando comparado com o LSA. Por esta razão, este antígeno foi escolhido para análise nos grupos de estudo. Após, estabelecimento das condições de cultivo, 19 cães foram incluídos em nosso estudo, sendo 7 para o grupo controle, 7 para o grupo sintomático e 5 para o grupo assintomático. Foi observado que apesar de não haver diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados, de forma descritiva o estímulo da Lci13 em animais controle foi bastante promissor, com a expressão positiva para IFN- γ e TNF, além da presença da IL-10 atuando como regulador da resposta imune, e uma expressão negativa para TGF- β . Além disso, a correlação entre IFN- γ e TNF ($p=0,042$) e IFN- γ e IL-10 ($p=0,049$) foi significativa e indicou uma forte correlação positiva entre as citocinas. Para os grupos sintomáticos e assintomáticos apenas o TNF foi expresso de forma positiva, havendo uma supressão de TGF- β . A partir dos resultados obtidos, o estudo foi capaz de fornecer subsídios científicos com relação a imunologia na LVC. O antígeno Lci13 em cães controle apresentou um bom desempenho, abrindo espaço para novas pesquisas para desenvolvimento de uma vacina profilática.

Palavras-Chave: Leishmaniose Visceral Canina. Antígenos recombinantes. Resposta imune.

SILVA, Lays Adrianna Mendonça Trajano. **Characterization of the cellular immune response in dogs opposite to new antigens of *Leishmania infantum***. 2017. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Applied to Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

The immune response in Visceral Canine Leishmaniasis (VCL) is important for the control and cure of infection. In this regards, proteins that stimulate a Th1-type profile have been explored as vaccine candidates. In this way, the objective of this study was to evaluate the cellular immune response of dogs against new recombinant proteins, to obtain scientific subsidies that guide vaccination studies. For this, blood samples from dogs with LV residing in an endemic area in Pernambuco was performed. A pilot study was conducted to select in vitro stimuli, as well as antigenic concentrations and culture time. After separation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), the cells were challenged with Lci10, Lci13 antigens and Q1 chimeric protein at the 2.5µg/mL, 5µg/mL and 10µg/mL, and soluble crude antigen from *L. infantum* (LSA) at 10µg/mL and 25µg/mL for 24h, 48h and 72h. At the end of the culture time the total RNA was extracted and a cDNA reverse transcriptase was performed to evaluate the gene expression for the cytokines IFN-γ, TNF, IL-2, IL-4, IL-10 and TGF-β, through comparative Ct method by RT-PCR in real time. For the LSA, the concentration of 25µg/mL was chosen, since it had a better expression of the cytokines of both Th1 and Th2 profiles. PBMC cultures challenged with Lci13 antigen (5µg/mL, 24h) presented the best protective cytokines expression profile (Th1) compared to LSA. For this reason this antigen was chosen for further analyses on studied dogs groups. After the establishment of culture conditions, 19 dogs were included in our study, 7 for the control group, 7 for the symptomatic group and 5 for the asymptomatic group. Although there were no statistically difference between analyzed groups, animal challenged with Lci13 demonstrated to be very promising with positive expression. For IFN-γ and TNF. In addition, this dogs also presented IL-10 acting, as regulator of the immune response, and a negative expression for TGF-β. The correlation between IFN-γ and TNF ($p = 0.042$) and IFN-γ and IL-10 ($p = 0.049$) was significant indicating a positive correlation between the cytokines. For the symptomatic and asymptomatic groups only TNF was expressed positively, with a suppression of TGF-β. From the results obtained, the study was able to provide scientific subsidies regarding the immunology of VCL. The Lci13 antigen in control dogs presented a good performance, open field for further research on develop a prophylactic vaccine.

Key-words: Canine Visceral Leishmaniasis. Recombinant antigens. Immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	21
Figura 2-	Manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina	23
Quadro 1-	Formulações repelentes testadas para controle de infecção de Leishmaniose Visceral Canina	26
Figura 3-	Via clássica do papel do macrófago no direcionamento do perfil de resistência (Th1) ou susceptibilidade à infecção por <i>Leishmania</i> spp.	27
Figura 4-	Fórmula para calcular o $\Delta\Delta Ct$ e obter a expressão relativa (RQ) do mRNA do gene alvo.	42
Quadro 2-	Cães provenientes da cidade de Caruaru-PE, utilizados para a cinética de tempo vs concentração dos novos antígenos recombinantes (Lci10, Lci13 e Q1).	43
Figura 5-	Visão geral da cinética tempo vs concentração do LSA nas concentrações de 10 μ g/mL e 25 μ g/mL.	45
Figura 6-	Panorama geral da cinética da Lci10, com as concentrações estimuladas (2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL e 10 μ g/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.	47
Figura 7-	Panorama geral da replicata biológica da cinética da Lci10 com a concentração de 5 μ g/mL nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.	49
Figura 8-	Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Lci10 e LSA.	50

Figura 9-	Panorama geral da cinética da Lci13, com as concentrações utilizadas (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.	51
Figura 10-	Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Lci13 e LSA no tempo de 24h.	53
Figura 11-	Panorama geral da cinética da Q1, com as três concentrações estimuladas (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.	54
Figura 12-	Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Q1 e LSA no tempo de 48h.	56
Figura 13-	Comparação entre os antígenos Lci10, Lci13 e Q1 em suas melhores concentrações e tempos de cultivo.	57
Quadro 3-	Classificação dos cães nos grupos de estudo de acordo com os critérios descritos no tópico 5.1.4.	58
Figura 14-	Expressão gênica das citocinas em cães do grupo controle após estímulo com a Lci13.	59
Figura 15-	Expressão gênica das citocinas em cães do grupo sintomático após estímulo com a Lci13.	60
Figura 16-	Expressão gênica das citocinas em cães do grupo assintomático após estímulo com a Lci13.	62
Figura 17-	Expressão gênica das citocinas dos grupos estudados após estímulo com a Lci13.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores da quantificação relativa (LogRQ) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com o LSA nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (10 µg/mL e 25 µg/mL).	46
Tabela 2-	Valores da quantificação relativa (LogRQ) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Lci10 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL).	48
Tabela 3-	Média da quantificação relativa (LogRQ) da expressão das citocinas após o estímulo com 5 µg/mL da Lci10 nos tempos de 24, 48 e 72h.	49
Tabela 4-	Valores da quantificação relativa (LogRQ) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Lci13 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL).	52
Tabela 5-	Valores da quantificação relativa (LogRQ) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Q1 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL).	55
Tabela 6-	Média dos valores das RQs por citocinas e <i>p-Value</i> do grupo controle.	59
Tabela 7-	Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo controle.	59
Tabela 8-	Média dos valores das RQs por citocinas e <i>p-Value</i> do grupo sintomático.	61
Tabela 9-	Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo sintomático.	61

Tabela 10-	Média dos valores das RQs por citocinas e p-Value do grupo assintomático.	62
Tabela 11-	Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo assintomático.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG -	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
cDNA -	Ácido Desoxirribonucléico complementar
Ct -	Ciclo <i>Threshold</i> (Ciclo limiar)
DNA -	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP -	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Deoxinucleotídeo trifosfato)
DPP -	Plataforma <i>Dual Path</i> (Teste rápido Imunocromatográfico)
DECIT -	Departamento de Ciência e Tecnologia
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz
GAPDH -	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
Gp63 -	<i>Surface expressed glycoprotein</i>
HSP -	<i>Heat Shock Proteins</i> (Proteínas de choque térmico)
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IOC -	Instituto Oswaldo Cruz
IFN-γ -	Interferon <i>gamma</i>
IL -	<i>Interleucin</i> (Interleucina)
INPI -	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
kDNA -	Kinetoplast DNA (DNA do cinetoplasto)
LACK -	<i>Leishmania homologue of receptors for Activated C Kinase</i>
Lci -	<i>Leishmania chagasi-infantum</i>
LiESP -	<i>L. infantumexcreted-secreted proteins</i>
LINF -	<i>L. infantum</i>
LSA -	<i>Leishmania Soluble Antigen</i> (Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>)
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV -	Leishmaniose Visceral
LVC -	Leishmaniose Visceral Canina
MPA -	Medicação Pré-anestésica
mRNA -	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico mensageiro)
NO -	Óxido Nítrico
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PBMC -	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)

PE -	Pernambuco
PHA -	Phytohemaglutinina
Q1 -	Quimérica 1
qPCR -	<i>Quantitative real time PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real)
RIFI -	Reação de Imunofluorescência Indireta
RQ -	<i>Relative quantitation</i> (Quantificação Relativa)
RT-qPCR-	<i>Reverse Transcriptase real time PCR</i> (reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa).
SBF -	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE -	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SMF -	Sistema Monocítico Fagocitário
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β -	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento beta)
Tm -	<i>Melting Temperature</i> (Temperatura de fusão)
TNF -	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	21
2.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses	21
2.2 Dados epidemiológicos	22
2.3 Leishmaniose Visceral Canina	22
2.3.1 Diagnóstico da LVC	24
2.3.2 Prevenção e Tratamento da LVC	24
2.4 Resposta imune nas leishmanioses	26
2.5 Vacinas contra leishmaniose	29
2.5.1 Vacinas de primeira geração	29
2.5.2 Vacinas de segunda geração	30
2.5.3 Vacinas de terceira geração	30
2.5.4 Vacinas terapêuticas ou imunoterapia	31
2.6 Antígenos recombinantes para desenvolvimento de vacinas	32
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Desenho de estudo	37
5.1.1 Amostragem	37
5.1.2 Coleta de material	37
5.1.3 Diagnóstico para a leishmaniose visceral	38
5.1.4 Grupos de estudo	38
5.2 Obtenção dos antígenos recombinantes	39
5.3 Obtenção das frações antigênicas de <i>L. (L.) infantum</i>	39
5.4 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) e cultivo celular	40
5.5 Padronização da cinética tempo <i>versus</i> concentração	40
5.6 Avaliação da expressão de RNA mensageiro para citocinas	40
5.6.1 Extração de RNA por TRIzol	40

5.6.2	Transcrição reversa para Cdna	41
5.6.3	Quantificação da Expressão gênica das citocinas por RT-qPCR	41
5.7	Análise dos dados	42
5.8	Considerações éticas	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Padronização da cinética tempo <i>versus</i> concentração	43
6.1.1	Antígeno Solúvel de <i>L. infantum</i> bruto (LSA)	44
6.1.2	Antígeno recombinante Lci10	46
6.1.2.1	<i>Repetição para Lci10 5µg/mL</i>	48
6.1.2.2	<i>Comparação entre a melhor concentração da Lci10 e LSA</i>	49
6.1.3	Antígeno recombinante Lci13	50
6.1.3.1	<i>Comparação entre a melhor concentração da Lci13 e LSA</i>	52
6.1.4	Antígeno recombinante Q1	53
6.1.4.1	<i>Comparação entre a melhor concentração da Q1 e LSA</i>	55
6.1.5	Comparação dos três antígenos testados Lci10, Lci13 e Q1	56
6.2	Avaliação da Lci13 nos grupos de estudo	57
6.2.1	Grupo controle	58
6.2.2	Grupo sintomático	60
6.2.3	Grupo assintomático	61
6.2.4	Comparação entre os grupos de estudos para a Lci13	63
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÕES	70
9	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A -Ficha de avaliação clínica dos cães	82
	APÊNDICE B – TCLE	84
	ANEXO A -Certificado da licença na CEUA	85
	ANEXO B – Termo Aditivo ao Certificado de licença na CEUA	86

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae), os quais são transmitidos através da picada de insetos denominados flebotomíneos (CHAPPUIS et al., 2007; ELMAHALLAWY et al., 2014; STOCKDALE; NEWTON, 2013). As principais formas clínicas das leishmanioses são a forma cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA) e a visceral (Leishmaniose Visceral - LV), e ocorrem de acordo com a espécie parasitária envolvida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Para a forma visceral, o cão doméstico é considerado um reservatório de importância epidemiológica, uma vez que os casos humanos, normalmente, são precedidos por casos caninos. Além disso, os cães apresentam uma maior quantidade de parasitos na pele, favorecendo a infecção dos vetores (FEITOSA et al., 2000; MORAIS et al., 2013).

Recentemente foi aprovada no Brasil a comercialização do Milteforan® (Virbac, França/Brasil) para o tratamento da LVC, porém, o tratamento à base de medicamentos ainda não é recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) brasileiro, sendo necessários estudos para a avaliação da sua efetividade quanto a cura parasitológica dos cães acometidos pela doença (BRASIL, 2016a). Por recomendação do MS, cães confirmados como LV positivos devem ser submetidos à eutanásia, prática esta que não vem demonstrando eficácia na redução significativa da incidência da doença (BRASIL, 2014). Portanto, esforços para o desenvolvimento de métodos profiláticos eficazes, tais como vacinas, podem ser uma das poucas alternativas para o controle real das leishmanioses.

O padrão de resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN- γ , TNF, IL-12 e IL-2, tem sido associado ao controle da infecção por ativação macrófagica e destruição parasitária (AMEEN, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por IFN- γ (GOMES-SILVA et al., 2007). Estas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e sua consequente produção de IFN- γ e TNF (BARATTA-MASINI et al., 2007).

Durante a fase ativa da doença, o parasito se multiplica dentro das células do sistema fagocitário mononuclear presentes no baço, fígado e de medula óssea (GOTO; PRIANTI, 2009). O passo fundamental na geração de imunidade anti-*Leishmania* é a manutenção da proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺, que culmina na secreção de diferentes citocinas necessárias para a imunomodulação e a resistência. Esses linfócitos estão envolvidos na

produção das interleucinas IL-2, IL-12 e IFN- γ . A susceptibilidade a doença envolve a participação da IL-10 e de células B (GOTO;PRIANTI, 2009). Como consequência da ativação policlonal de células B, resultante da presença de grande número de parasitos na medula óssea e baço, um título excepcionalmente elevado de anticorpos contra os antígenos de *Leishmania* pode ser detectado, acarretando a formação e deposição de imunocomplexos e a forma grave da doença (OZBILDGE et al., 2006).

A partir desse conhecimento, a busca por antígenos que possibilitem o desenvolvimento de um perfil imunológico com ativação de células Th1, dentre eles, proteínas recombinantes e quimeras vem ganhando espaço por sua capacidade de estimular a imunidade a partir de regiões antigênicas presentes na sua constituição.

Desta forma, o presente estudo avaliou a resposta imune celular de cães positivos para LV, frente à proteína quimérica Q1 e os antígenos Lci10 e Lci13, desenvolvidas no IAM/FIOCRUZ-PE, comparando seus resultados com o Antígeno Solúvel de *L. infantum*(LSA).

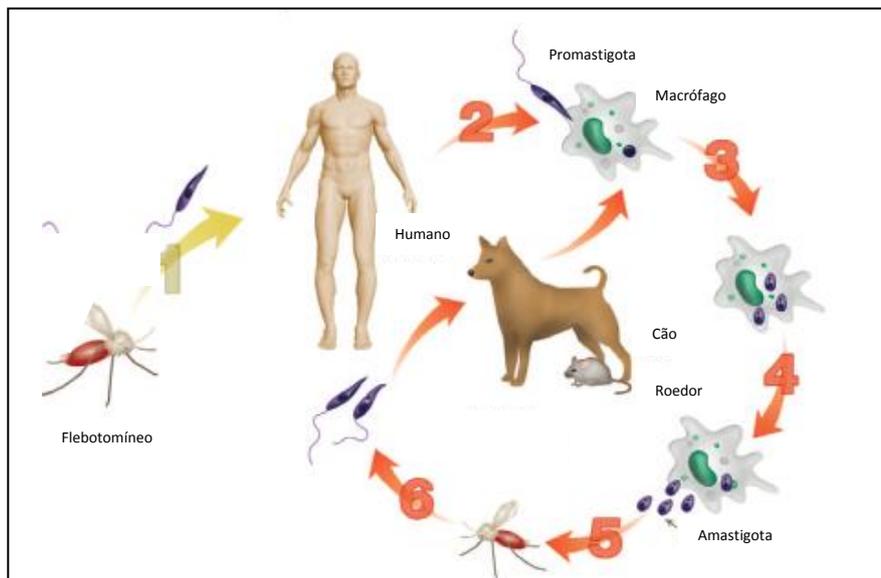
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae), parasitos intracelulares das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), os quais são transmitidos através da picada de insetos conhecidos como flebotomíneos (CHAPPUIS et al., 2007; ELMAHALLAWY et al., 2014; STOCKDALE; NEWTON, 2013).

O parasito possui duas formas no seu ciclo de vida: a promastigota, forma flagelada presente no intestino do inseto vetor, infectante ao hospedeiro vertebrado; e a amastigota, forma intracelular que se multiplica e dissemina pelo organismo do hospedeiro. As promastigotas são transmitidas ao indivíduo através da picada do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, as quais, ao serem fagocitadas por macrófagos, transformam-se em amastigotas. O ciclo de vida do parasito em seus dois estágios, exemplificando o desenvolvimento no hospedeiro humano e em outros hospedeiros, como o cão, ocorre de acordo com a figura 1 (KUMAR;ENGWERDA, 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

Figura 1- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Kumar e Engwerda (2014, tradução nossa).

Legenda:(1) A forma promastigota da *Leishmania infantum* é injetada no hospedeiro vertebrado (Humano, Cão ou roedor) durante o repasto sanguíneo;(2)estas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos;(3) Dentro do macrófago, as promastigotas se transformam na forma amastigota e (4)as quais se divide por divisão binária. (5) As amastigotas são liberadas pela ruptura dos macrófagos, e podem ser ingeridas pelo flebotomíneo durante alimentação. (6) Dentro do inseto, essas amastigotas se modificam em promastigotas, e podem reiniciar todo o ciclo.

De acordo com a espécie parasitária envolvida, a doença pode apresentar duas formas clínicas: a forma cutânea (Leishmaniose Tegumentar - LT), quando encontrada nas Américas é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e a forma visceral (Leishmaniose Visceral - LV), diferindo em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e taxas de incidência e de mortalidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Cerca de 30 espécies de *Leishmania* já foram identificadas, sendo 21 patogênicas ao homem (LÓPEZ-CÉSPEDES et al., 2012). As principais espécies encontradas em Pernambuco são *Leishmania (L.) infantum* (BRASIL, 2006) e *Leishmania (V.) braziliensis* (BRASIL, 2007), causando a LV e a LTA, respectivamente.

2.2 Dados epidemiológicos

As leishmanioses ocorrem em cinco continentes e são endêmicas em 98 países. Aproximadamente 310 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair alguma forma clínica da doença, e estima-se que 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente (ALVAR et al., 2012; DE MORAIS et al. 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). No cenário mundial, as leishmanioses encontram-se como doenças endêmicas e negligenciadas, colocando o Brasil como o principal responsável pelos casos registrados na América Latina (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014) mais de 90% dos casos reportados ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul.

Especificamente no Brasil, os casos de LV no período de 1990 a 2015 somam 81.722 casos, e aproximadamente 66,2% deles ocorrem na região Nordeste (BRASIL, 2016b). Em Pernambuco, entre 2010 e 2015, o estado teve notificação de 422 casos, com letalidade de 8,29%, o que demonstra a grande importância epidemiológica da doença neste estado (BRASIL, 2016b).

2.3 Leishmaniose Visceral Canina

Dentro do cenário da LV, o cão doméstico é considerado o principal reservatório. Devido ao contato próximo com humanos e a presença de grande quantidade de parasitas na pele, o cão, serve como fonte de alimento para o inseto vetor e permite a continuidade do ciclo de transmissão (NUNES et al., 2016; REIS et al., 2010; SEVÁ et al., 2016).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é considerada endêmica em mais de 70 países em todo o mundo, onde cerca de 2,5 milhões de cães são acometidos pela doença e a progressão dos sintomas é similar aos casos humanos (KASZAK et al., 2015; SCHAUT et al., 2016).

Dentre as manifestações clínicas da LVC podemos mencionar sinais dermatológicos (dermatites ulcerativas, esfoliativas e/ou nodulares e alopecia), onicogribose, perda de peso, atrofia muscular, hepato-esplenomegalia, febre, alterações renais (glomerulonefrites e nefrites), lesões nas mucosas (nasal, oral, genital), além de desordens neurológicas e vasculares (MARTINS et al., 2015; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; PALATNIK-DE-SOUZA, 2012). Alguns desses sintomas estão representados na figura 2.

Além dos testes laboratoriais, os cães podem ser classificados com base na sintomatologia clínica em duas apresentações distintas: assintomáticos, e sintomáticos (COURA-VITAL et al., 2011; MARTINS et al., 2015). Os cães sintomáticos possuem manifestações clínicas variáveis, desde alterações cutâneas até danos neurológicos e geralmente progridem para a morte. Já os assintomáticos são capazes de transmitir o parasito, sem sinais clínicos aparentes, tornando difícil a tarefa de estabelecer medidas eficazes de controle da doença (MARTINS et al., 2015; REIS et al., 2010; SEVÁ et al., 2016).

Figura 2- Manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina



Fonte: A autora a partir do portal Tudo sobre cachorros e APIPA10 (LEISHMANIOSE...,2017;CONHEÇA...,2017).

Legenda: (A) Onicogribose, (B) Conjuntivite, (C) Emagrecimento e (D) Dermatite ocular bilateral.

2.3.1 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC é similar ao realizado em humanos, podendo ser parasitológico, sorológico e molecular (FERREIRA et al., 2013).

O teste parasitológico baseia-se na visualização do parasita, por microscopia ótica, em amostras de punções hepática, linfonodos, esplênica, demedula óssea e biópsia ou escarificação de pele. Porém, este método é bastante invasivo e causa risco aos animais (BRASIL, 2006).

Por recomendação do MS, outras metodologias são utilizadas, como testes sorológicos, através da realização de imunofluorescência indireta (RIFI), e confirmação por ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*- ELISA) (BRASIL, 2006; FERREIRA et al., 2013; SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO AO ANIMAL, 2011). O teste rápido imunocromatográfico DPP® (Biomanguinhos, Rio de Janeiro/Brasil), realizado para triagem dos cães, é o mais utilizado por produzir um resultado rápido, mas devido a sua alta taxa de reações cruzadas, faz-se necessário uma confirmação por ELISA (FRAGA et al., 2016).

Devido a limitações destes testes, o uso de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, vem sendo exploradas para um diagnóstico específico e sensível, mas ainda estão restritas a centros de pesquisa e laboratórios de referência em doenças negligenciadas (ALMEIDA et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; CHAOUCH et al., 2013).

2.3.2 Prevenção e Tratamento da LVC

Assim como é necessário um diagnóstico eficiente, medidas de prevenção e tratamento são de extrema importância para o controle da LVC. O uso de inseticidas, tratamento com drogas, vacinas e a eliminação de cães infectados, são algumas das estratégias utilizadas em regiões endêmicas para interromper o ciclo de transmissão do parasito (FOROUGHIPARVAR; HATAM, 2014; REGUERA et al., 2016).

De acordo com Regueira et al. (2016), a quimioterapia utilizada contra a leishmaniose foi desenvolvida há muitos anos, e apesar de muitos efeitos colaterais, ainda é a mais utilizada, por promover a redução da prevalência e incidência da doença, levando uma quebra no ciclo de transmissão do patógeno. Apesar da diminuição na carga parasitária em cães infectados, os

medicamentos disponíveis hoje não são capazes de promover uma cura parasitológica (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014).

Em países onde é permitido o tratamento dos cães infectados, independente do fármaco utilizado, a escolha da droga e o sucesso da terapia variam de acordo com o estado clínico e imunológico do animal, sendo necessário um monitoramento de fatores bioquímicos para acompanhar as funções renal e hepática, aspectos hematológicos e acompanhamento da carga parasitária, a fim de confirmar a eficácia da medicação aplicada (CORTESE et al., 2015; REGUERA et al., 2016).

Dentre as drogas mais utilizadas, a Miltefosina, interfere no metabolismo de ácidos graxos e esteróis da membrana plasmática de amastigotas, induzindo assim a morte desses parasitas por mecanismos de apoptose (RAKOTOMANGA et al., 2007; REGUERA et al., 2016; ULIANA et al., 2016). Esta droga já é utilizada como de primeira escolha para tratamentos de LVC em países do sul da Europa (REGUERA et al., 2016).

No Brasil, uma nota técnica emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários – DFIP-SDA – CPV, autorizou a comercialização do Milteforan® (Virbac, França/Brasil) para o tratamento da LVC (BRASIL, 2016a). Esta droga que tem como princípio inibir a síntese da membrana celular do parasito, interrompendo as vias de sinalização celulares (ULIANA et al., 2016). Porém, o tratamento à base de medicamentos ainda não é recomendado pelo Ministério da Saúde brasileiro, por ser responsável apenas pela remissão dos sintomas clínicos, não sendo confirmada a cura parasitológica, mantendo assim o ciclo de transmissão (BRASIL, 2016a).

O Alopurinol, administrado sozinho ou combinado com outros compostos, administrado para tratamento em humanos, está sendo utilizado também em cães com LV, agindo na inibição da transcrição e tradução de proteínas da *Leishmania* (REGUERA et al., 2016).

A Domperidona tem sido utilizada em países Europeus, a fim de reduzir os riscos da infecção em casos de contato com *L. infantum* em estágios iniciais da LVC, atuando como um imunomodulador, capaz de induzir o aumento de citocinas do perfil Th1 como IFN- γ , TNF e IL-12, necessárias para o combate ao parasito, por ativar macrófagos e células *natural killers* (NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014; SABARÉ et al., 2014).

Outras drogas como Aminosidina/paromomicina e anfotericina B, que auxiliam na redução dos sinais clínicos, também são utilizadas. No entanto, estas possuem efeitos colaterais tóxicos para o animal e não levam a cura parasitológica (REGUERA et al., 2016). A Pentamidina, Marbofloxacin e Metronidazole e combinações, que atuam inibindo a replicação do DNA e transcrição de proteínas alterando o metabolismo do parasito, ainda não

apresentam uma eficácia clara quanto a cura parasitológica (MATIN et al., 2014; REGUERA et al., 2016).

Quanto as ações preventivas, o MS brasileiro recomenda a utilização de coleiras impregnadas com formulações contendo 4% de Deltametrina, composto utilizado no combate ao vetor, a qual tem demonstrado a proteção de cães durante 4 a 6 meses, com redução na transmissão, repelindo o flebotomíneo e evitando o repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; REGUERA et al., 2016; SEVÁ et al., 2016). Outras formulações, descritas no quadro 1, também estão sendo testadas e variam na forma de aplicação e duração da proteção (BRIANTI et al., 2014; FRANC et al., 2015; OTRANTO et al., 2010; WYLIE et al., 2014).

Quadro 1-Formulações repelentes testadas para controle de infecção da Leishmaniose Visceral Canina

Formulação	Duração
65% de Permetrina	2 semanas
50% de Permetrina + 10% de Imidacloprid	3-4 semanas
61% de Permetrina + 54,5% de Fipronil	4 semanas
10% de Imidacloprid + 4,5% de Flumetrina	8 meses

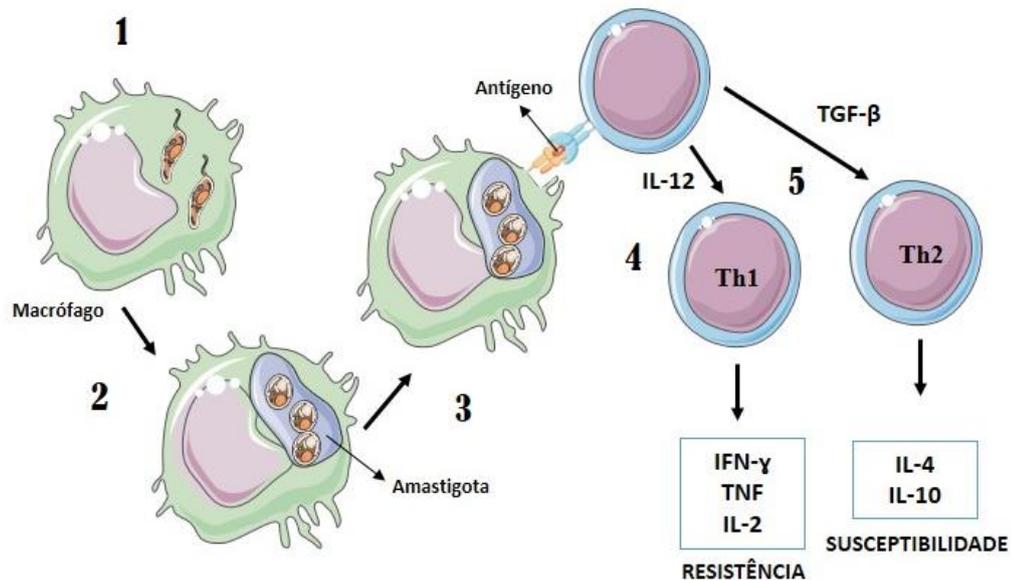
Fonte: Adaptado de Reguera et al (2016, tradução nossa).

Porém, a medida de controle indicada ainda é a eutanásia de cães soropositivos, mas, essa prática não está diminuindo efetivamente o número de casos humanos e caninos e, na ausência de outras estratégias bem sucedidas, o desenvolvimento de vacinas contra a LVC tem mostrado ser bastante promissora (COSTA-PEREIRA et al., 2015).

2.4 Resposta imune nas Leishmanioses

Um ponto chave para a infecção por *Leishmania* spp. está na capacidade de evasão do parasita ao sistema imune do hospedeiro, levando a uma maior susceptibilidade no estabelecimento dos sintomas característicos da doença (SRIVASTAVA et al., 2016; DE MORAIS et al., 2015). O curso da infecção por *L. infantum* em cães depende da resposta imune do hospedeiro, persistência e multiplicação do parasita (COSTA-PEREIRA et al., 2015). Os macrófagos e as células dendríticas, células da imunidade inata, possuem um papel crucial mediando resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. (Figura 3) (SRIVASTAVA et al., 2016).

Figura 3 – Via clássica do papel do macrófago no direcionamento do perfil de resistência (Th1) ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp.



Fonte: A autora

Legenda: (1) Após a forma promastigota ser fagocitado pelo macrófago e, (2) se transformar em amastigoto, (3) ocorre a apresentação do antígeno do parasita ao linfócito T. A partir dessa apresentação a resposta à infecção pode seguir de duas formas: (4) A liberação de IL-12 leva a uma resposta protetora do tipo Th1, com a expressão de citocinas IFN- γ , TNF e IL-2, promovendo o controle da infecção; (5) A presença do TGF- β , leva a um perfil mais susceptível a infecção, com a expressão de citocinas IL-4 e IL-10, levando ao aparecimento dos sintomas característicos da doença no cão.

Estudos recentes vêm demonstrando o envolvimento dos neutrófilos no início da infecção. Estas células ao serem recrutadas para o local da picada do flebotomíneo, são infectadas por *Leishmania* spp. e levadas à apoptose (ALMEIDA et al., 2013; DE MORAIS et al., 2015; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Macrófagos são recrutados e fagocitam os corpos apoptóticos desencadeando a sinalização de vias anti-inflamatórias (DE MORAIS, et al., 2015). Esse processo permite a entrada dos parasitos de forma silenciosa e o sucesso da infecção (CARLSEN et al., 2015).

Apesar da necessidade de melhor entendimento sobre a função dos neutrófilos na LVC, já foi descrito por Almeida et al. (2013) que o fenótipo dessas células varia de acordo com a gravidade da doença em cães. Os animais com quadro clínico grave, são mais propensos à apoptose por possuírem um fraco processo oxidativo, favorecendo a multiplicação parasitária (ALMEIDA et al., 2013). Em cães com menos manifestações clínicas, há um melhor processo oxidativo, auxiliando os macrófagos no processo de eliminação do parasito.

De um modo geral, o quadro clínico e a resposta imune são semelhantes quando comparamos cães e humanos. Por outro lado, os mecanismos de resistência ou

susceptibilidade, em ambos os casos, ainda não foram completamente elucidados(BANETH;AROCHE, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016).

A imunidade protetora gerada pela resistência à infecção é predominantemente mediada por imunidade celular, e tem sido associada com a ativação do perfil de resposta do tipo Th1, através da secreção de citocinas como IFN- γ e IL-2. Estas citocinas, atuam na ativação de macrófagos, o quais produzem óxido nítrico (ON), promovendo a atividade leishmanicida para o controle da disseminação parasitária (DUARTE et al., 2016; MORENO et al., 2014; REIS et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2016). A produção de IL-12 por células dendríticas auxilia na diferenciação as células T virgens para células do tipo Th1, e estimulam o aumento de secreção de IFN- γ por estas células (DUARTE et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

Cães assintomáticos possuem elevados níveis de IFN- γ , sendo esta citocina considerada protetora evitando o aparecimento de sintomas (REIS et al., 2010). Além da proliferação de células TCD4⁺, o envolvimento de células TCD8⁺ no processo de proteção e controle da infecção, também foi observado em cães assintomáticos infectados experimentalmente por *L. infantum*, sendo este envolvimento ligado ao aumento e manutenção da resposta do tipo Th1 (BARBIÉRI, 2006; DUARTE et al., 2016; SCHAUT et al., 2016).

Em contrapartida, o perfil de resposta celular, que leva a secreção de citocinas como IL-4 e TGF- β , promove uma resposta predominantemente humoral, induzindo o aparecimento dos sintomas da doença, sendo associada a alterações imunológicas envolvendo células T. Como consequência da produção dessas citocinas, tem-se a inibição da produção de ON por macrófagos e diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1, assim como diminuição na produção de IFN- γ e TNF (CARNEIRO-DE-FREITAS et al., 2013; COSTA-PEREIRA et al. 2015; DUARTE et al., 2016). Além destas citocinas anti-inflamatórias, a IL-10, encontrada em grande concentração no baço, levam a formação de um granuloma celular que auxilia na manutenção e sobrevivência do parasito no hospedeiro (SRIVASTAVA et al., 2016).

Alguns autores identificaram a presença de células T regulatórias (Tregs) durante a infecção por *L. infantum* em cães (CORTESE et al., 2013; HOSEIN et al., 2017; MENEZES-SOUZA et al., 2011; SILVA et al., 2014). Os linfócitos Tregs atuam na produção de citocinas imunoregulatórias como IL-10 e TGF- β , destacando o seu papel durante o perfil de susceptibilidade a infecção (Th2), favorecendo assim a multiplicação parasitária (KHADEM; UZONNA, 2014). No entanto, o papel dos linfócitos Tregs na LVC ainda requer mais estudos para avaliar o seu real envolvimento durante o processo de infecção (HOUSEIN et al., 2017).

A diferença na proporção da produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2, diferencia os cães sintomáticos dos assintomáticos. Dentre os fatores que influenciam essa produção de citocinas está a variação genética do hospedeiro e do parasita, ou ainda fatores do acaso como localização, tamanho do inóculo e número de picadas (MICHELIN et al., 2011; REIS et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2016). Segundo HOSEIN et al (2017), esse *mix* de respostas Th1/Th2 é observado em diferentes órgãos de cães com LVC, tendo correlação com a presença ou ausência dos sintomas e os dados de carga parasitária.

2.5 Vacinas contra leishmanioses

A imunização de cães é considerada o método mais adequado para um controle da infecção por *L. infantum*, uma vez que previne a transmissão do parasita para o inseto vetor e consequentemente, reduz a transmissão para humanos (FERNANDES et al., 2014). Neste contexto, os avanços na área da vacinologia, tem motivado a busca por novos antígenos (FOROUGHI-PARVAR; HATAM, 2014; JAIN et al., 2015).

As vacinas são divididas em três categorias de acordo com o tipo de antígeno utilizado: vacinas com parasitos atenuados e vacinas com parasitos mortos ou fragmentados (primeira geração), vacinas utilizando proteínas recombinantes (segunda geração) e vacinas de DNA (terceira geração) (JAIN et al., 2015; REIS et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2016).

2.5.1 Vacinas de primeira geração

A composição dessas vacinas consiste na utilização de parasitos mortos ou atenuados, ou ainda fragmentos, juntamente com adjuvantes, sendo administradas em ensaios clínicos randomizados para fins profiláticos (REGUERA et al., 2016; REZVAN et al., 2015). No entanto, a eficácia deste tipo de imunização depende de muitos fatores como a dose, adjuvante utilizado e vias de administração (REZVAN et al., 2015).

Estudos realizados em cães, no Irã, utilizando composições de *L. major* atenuada associada a hidróxido de alumínio e *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) como adjuvante obtiveram uma eficácia de 69,3% em triagens clínicas, sendo relatadas apenas irritações na pele no local da injeção (MOHEBALI et al., 2004; REGUERA et al., 2016).

Outras vacinas, utilizando o parasita morto, foram testadas, mas sem sucesso, como é o caso da Leishvaccine, que utilizava promastigosta de *L. braziliensis* e BCG como adjuvante. Este tipo de vacina obteve 90% de proteção em condições controladas, mas falhou no estudo

de fase III realizado em cães de áreas endêmicas para LVC no Brasil (GENARO et al., 1996; MAYRINK et al., 1996; REGUERA et al., 2016).

2.5.2 Vacinas de segunda geração

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, muitas moléculas presentes em *Leishmania* tem sido estudadas com a perspectiva de utilização em ensaios vacinais (DUARTE et al., 2016).

Até o momento, duas vacinas protéicas foram licenciadas para uso em cães na Europa. A CaniLeish[®] (Virbac, França), que possui na sua formulação proteínas de *L. infantum* excretadas (LiESP) e suplementada com adjuvantes derivados de saponina QA-21, sendo capaz de estimular uma resposta humoral por aumentar os níveis de IgG2, levando a uma forte mudança para o perfil Th1, com uma eficácia de 68,4% de proteção (OLIVA et al., 2014; REGUERA et al., 2016). A vacina LETIFEND[®] (LETI Univet, ES), licenciada na Espanha, utiliza uma proteína quimérica formada por cinco fragmentos antigênicos de proteínas ribossômicas de *L. infantum*, sendo administrada sem a presença de adjuvantes. Estudos com essa vacina, demonstraram uma forte proteção com 72% de eficácia, na maioria dos cães vacinados com redução dos sinais clínicos e a depuração da carga parasitária durante o primeiro ano após o desafio (CARCELÉN et al., 2009; REGUERA et al., 2016; RIERA, 2017).

No Brasil, duas vacinas iniciaram avaliações em cães: A Leishmune[®] (Zoetis, Campinas, Brasil) que foi licenciada pelo Ministério da Agricultura em 2003, mas teve sua comercialização suspensa em 2014 por não cumprir os pré-requisitos dos ensaios clínicos de fase III (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2014) e a Leishtec[®] (Hertape S.A., Juatuba, Brasil) composta pelo antígeno recombinante A2, proteína de diferentes espécies de *Leishmania*, que foi licenciada em 2007 e está disponível no mercado, com uma eficácia de 71%, induzindo uma resposta celular Th1 (FERNANDES et al., 2014; MENDONÇA et al., 2016; SHAHBAZI et al., 2015).

2.5.3 Vacinas de terceira geração

A terceira geração de vacinas consiste na utilização de DNA geneticamente modificado com o intuito de promover uma resposta imunológica efetiva (KUMAR; SAMANT, 2016).

As vacinas de DNA têm se mostrado promissoras em testes com modelos animais, apresentando vantagem de não necessitar de esquemas de refrigeração (Rede de frio ou cadeia

fria), mantendo a estabilidade da molécula utilizada. Esta vantagem tem estimulando a comunidade científica a realizar mais estudos para o desenvolvimento de vacinas contra a LVC (FOROUGHIPARVAR; HATAM, 2014; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001).

A utilização das vacinas de DNA contra as leishmanioses induz uma resposta imune completa contra o antígeno codificado, levando ao aumento de citocinas do perfil Th1 e estímulo à proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos; células essenciais para o combate ao parasito e controle da infecção (KAYE; SCOTT, 2011; STANLEY et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2016).

Apesar das inúmeras vantagens que oferecem, como a expressão de antígenos de *Leishmania* que são inalterados na sua estrutura proteica e antigenicidade; as vacinas de DNA podem induzir uma resposta imunitária do hospedeiro contra o plasmídeo, quando este se integra ao genoma animal vacinado; ou ainda a utilização de marcadores de resistência a antibióticos presentes no plasmídeo pode dificultar o combate à eventuais infecções bacterianas (REGUEIRA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

2.5.4 Vacinas terapêuticas ou imunoterapia

As vacinas terapêuticas ou imunoterapia tem sido uma alternativa atrativa para o tratamento da LVC (TRIGO et al., 2010). Essas vacinas podem ser utilizadas sozinhas ou combinadas com drogas anti-leishmania, promovendo uma ação direta ou indireta com o intuito de reestabelecer a imunidade do cão, com a vantagem de possuir um desenho mais simples de ensaios clínicos, através da triagem e ensaio de interação de moléculas por bioinformática (KUMAR; SAMANT, 2016; ROATT et al., 2017).

A imunoterapia contra LT foi inicialmente descrita com a utilização de formas promastigotas de *Leishmania* atenuadas por calor juntamente com o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) como adjuvante, em pacientes humanos na Venezuela. No entanto, houve uma reatividade baixa nos grupos testados (CONVIT et al., 2003). No Brasil, estudos utilizando uma vacina composta por antígenos de *L. amazonensis* com o BCG como adjuvante, demonstraram 98% de cura clínica em pacientes com LT, quando utilizada em associação com o tratamento com antimônio. Esta terapia também foi capaz de reduzir os efeitos colaterais da droga apresentando uma taxa de cura similar à do tratamento padrão (MAYRINK et al., 2006).

Em modelos murinos infectados com *L.donovani*, a utilização de Proteína de Superfície Acilada Hidrófila B (HASPB) e Proteína de Membrana de Kinetoplastid 11 (KMP11), administrados por dose única, reduziu significativamente a carga parasitária, assim como o aumento na produção da citocina IFN- γ . No entanto, houve também a presença de IL-4 durante os ensaios (MORTAZAVIDEHKORDI et al., 2016).

Algumas proteínas já foram testadas para uso em cães, como o Antígeno vacinal de poliproteína recombinante-Leish-111f, formulado com monofosforil lípido A em emulsão estável (Leish-111f + MPL-SE), que proporcionou 75% (IC 43-95%) de cura clínica em cães com LVC, (TRIGO et al., 2010). Outro exemplo é a utilização do Agregado protéico de magnésio-amônio anidrido fosfolinoleato-palmitoleato (P-MAPA), em cães sintomáticos, demonstrando não só a melhoria da sintomatologia clínica, como também o aumento de IL-2 e IFN- γ e diminuição de IL-10, exercendo uma função imunomodulatória eficaz (ROATT et al., 2017; SANTIAGO et al., 2013).

2.6 Antígenos recombinantes para desenvolvimento de vacinas

Para garantir o sucesso de uma vacina, é necessário que os antígenos utilizados sejam capazes de induzir uma imunidade Th1 forte e duradoura, prevenir o estabelecimento de uma infecção inicial ou controlar a progressão da doença para um estado mais severo. Ainda com este propósito, a utilização de adjuvantes auxilia no estabelecimento dessa imunidade celular protetora (GRADONI, 2015). Dessa forma, a ausência de uma resposta Th1 eficaz está associada à progressão da doença, há uma necessidade de reforçar essa resposta a fim de aumentar o estímulo à produção de citocinas que protegem e combatem a infecção, mantendo o cão saudável (MORENO et al., 2014).

Outras características devem ser avaliadas após a identificação de um potencial antígeno, como a estabilidade em solução, sua definição química e físico-química, pureza, a capacidade de induzir a produção de anticorpos, ativar linfócitos e desenvolver memória imunológica, a fácil obtenção com baixo custo e não devem conter contaminantes decorrentes do processo de produção e purificação (LEAL, 2004).

A utilização de proteínas recombinantes associadas a adjuvantes como candidatos vacinais tem sido uma alternativa para a vacinação em massa, devido a sua produção através da clonagem de DNA e expressão em vetores microbianos, facilitando a obtenção em larga escala e de forma rentável (REZVAN et al., 2015).

A primeira proteína recombinante utilizada como antígeno para vacina contra a leishmaniose foi a *leishmanolysin*, baseada no uso da Gp63, maior glicoproteína de superfície presente em todas as espécies de *Leishmania* (SUKUMARAN; MADHUBALA, 2004; REZVAN et al., 2015). Outros estudos sugeriram, como a utilização do gene codificador para LACK (*Leishmania homologue of receptors for Activated C Kinase*), proteína expressa nas formas amastigota e promastigota do parasito, conferindo uma forte proteção por diferentes vias de administração (AHMED et al., 2004; GURUNATHAN et al., 1997; HEZARJARIBI et al., 2013; REZVAN et al., 2015; SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al., 2013).

A LEISH-F1 é uma junção de três proteínas que estão em regiões conservadas da *Leishmania*, incluindo *L. donovani* e *L. infantum*, e seu ensaio de imunização mostrou que há um aumentada produção de IFN- γ e proteção em camundongos infectados por *L. major* (REZVAN et al., 2015; SAKAI et al., 2010).

Nos últimos 10 anos, antígenos de *L. chagasi-infantum* (Lci) nativos foram identificados com grande potencial para sua utilização no diagnóstico de LV humana e canina (CASTRO NETO, 2014; OLIVEIRA et al., 2011; NASCIMENTO, 2014). Vários destes antígenos ainda não haviam sido descritos na literatura, enquanto outros se mostraram relacionados, porém não idênticos, a antígenos já descritos (CAMPOS, 2007; MAGALHÃES, 2007; SANTOS, 2015). Dentre os antígenos identificados, a Lci10, é uma proteína que contém múltiplos domínios repetitivos de diferentes tamanhos (variando de 68 a 198 aminoácidos), os quais se seguem a uma região N-terminal não repetitiva (MAGALHÃES, 2007). A Lci10 apresentou sensibilidade de 79% e especificidade de 100%, com um intervalo de confiança de 55,88-86,21% em testes realizados com soros de cães para fins diagnósticos (dados submetidos a publicação).

A Lci13, outro antígeno identificado, faz parte da subclasse das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*– HSP) HSP70: HSP70 mitocondriais (HSP70mts). As HSP70mts realizam as mesmas funções da sua homóloga HSP70 citoplasmática, porém tem como local de ação o interior da mitocôndria. Essas HSP70mts são caracterizadas por possuírem, na sua extremidade amino-terminal, uma sequência-sinal que permite sua translocação para o interior da mitocôndria. Essa sequência-sinal é composta por resíduos dos aminoácidos básicos arginina e/ou lisina que são carregados positivamente e sem nenhum resíduo ácido. Por sua vez, a extremidade C-terminal apresenta uma sequência rica em aminoácidos hidrofílicos (CAMPOS, 2007). Este antígeno apresentou sensibilidade de 87% e especificidade de 100%, com um intervalo de confiança de 85,84-99,93% em teste realizados com soros de cães para fins diagnósticos (dados submetidos a publicação).

Além destes, conforme resultados previamente obtidos por Santos (2015), foram selecionadas três proteínas de *L. infantum* para as construções da proteína quimérica (Q1), são elas: Lci2 – kinesina; Lci3 – proteína hipotética; Lci12 – proteína hipotética (especifica do gênero *Leishmania*). Na sequência codificada Q1, foram incluídas regiões otimizadas na porção N-Terminal como: pRBS-SD1+6AA (sítio de ligação do ribossomo e sequência Shine-Dalgarno), pSS-gIII (Sequência N-terminal para otimizar expressão, proteína de envelope de fago), T7 tag (Sequência N-terminal para estabilizar e otimizar expressão), ET-6His (Cauda de Histidina para purificação da proteína) e códon de terminação da tradução. À sequência desses genes sintéticos, acrescentaram-se ainda sítios de enzimas de restrição em pontos estratégicos ao longo das construções, de forma a permitir a fácil modificação do gene quimérico, incluindo ou excluindo algumas sequências. Após síntese química destes genes, a combinação gerada codificando a Q1, se mostrou capaz de levar a expressão das proteínas recombinantes após transformação em células de *Escherichia coli*. Testes realizados em soro de cães para fins diagnósticos demonstraram uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%, com um intervalo de confiança de 85,84-99,93% (dados em processo de patente).

Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa de biologia celular de tripanosomatídeos do IAM/FIOCRUZ-PE, demonstraram que os antígenos Lci nativos, apresentaram uma boa resposta antigênica contra soro de cães, abrindo novas perspectivas para estudos desses alvos como candidatos vacinais (CASTRO NETO, 2014; OLIVEIRA et al., 2011; MAGALHÃES, 2007; NASCIMENTO, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Dada a importância do cão, como reservatório de importância epidemiológica, no ciclo de transmissão da LV, se faz necessário estudos que possam caracterizar novos alvos para o desenvolvimento de medidas de controle eficazes capaz de promover a proteção desses animais e conseqüentemente a diminuição os humanos.

Uma colaboração entre pesquisadores do Grupo de Pesquisas de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) e Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPqGM/FIOCRUZ-BA, identificou um total de 13 antígenos (Lci1 a 13), sendo a maioria incluída em um pedido de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) pela FIOCRUZ (número de registro – PI0900961-2; data de depósito – 23/03/2009) utilizados para fins de diagnóstico da LV.

Os resultados obtidos com os antígenos Lci's nativos, demonstraram boa resposta antigênica e boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico utilizando soro de cães, o que os torna promissores também, para utilização em estudos na área da vacinologia, conforme descrito no tópico 2.6, este potencial ainda não havia sido explorado.

Desta forma, o presente estudo avaliou a resposta imune celular de cães positivos para LV, após estímulo com a proteína quimérica Q1 e os antígenos Lci10 e Lci13, desenvolvidas no IAM/FIOCRUZ-PE. Essa avaliação foi capaz de fornecer subsídios científicos que direcionem estudos para o desenvolvimento de vacinas (proteicas e/ou DNA), com aplicações para a Saúde Pública, objetivando a promoção de melhorias na qualidade de vida da população afetada, aliadas ao bem-estar animal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imune celular de cães após estímulo com novos antígenos de *L. infantum*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer o melhor tempo de cultivo e a concentração antigênica ótima após estímulo *in vitro* de PBMC com a proteína recombinante Q1, antígenos Lci10 e Lci13 e antígeno solúvel de *Leishmania infantum*;
- b) Definir, dentre os avaliados, o antígeno a ser usado no estudo com base no melhor desempenho quanto ao balanço das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β através da expressão gênica;
- c) Avaliar a expressão gênica para as citocinas estudadas nos diferentes grupos de análise (Assintomáticos, Sintomáticos e Controle) com o antígeno escolhido.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho de estudo

Estudo analítico observacional do tipo caso-controle que buscou verificar a associação da resposta imune celular de PBMC estimuladas *in vitro* com antígeno específico de *L. infantum* através da avaliação da expressão de citocinas em cães com diferentes manifestações clínicas.

5.1.1 Amostragem

Como este estudo é pioneiro e considerado piloto, para verificar se uma resposta imune celular é induzida pelo antígeno e considerando que as abordagens metodológicas são complexas e de alto custo, a amostra foi definida a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (REIS, 2003). Foram obtidas amostras de sangue de cães, de raças variadas e idades entre 1 a 7 anos, ambos os sexos, domiciliados, provenientes da cidade de Caruaru, mesorregião no agreste Pernambucano.

5.1.2 Coleta de material biológico

Para os animais cujo procedimento de coleta incluiu punção medular e/ou de linfonodo, houve aplicação subcutânea de atropina, na dose de 0,044 mg/kg como medicação pré-anestésica (MPA). Após 5 a 10 minutos de latência, sendo observada uma discreta taquicardia, foi iniciada anestesia dissociativa com aplicação por via intramuscular da associação de xilazina (1mg/kg) e quetamina (15 mg/kg). Após cinco minutos de latência (MANSONI, 2008), foram iniciados os procedimentos de coleta de sangue (utilizando seringa de 10 mL acoplada a agulha 25x7 mm), punção de medula óssea na crista do osso esterno (seringa de 20 mL, agulha 25x7 mm) e/ou punção de linfonodo poplíteo (seringa de 10 mL, agulha 25x7 mm). Apenas animais que apresentaram hipertrofia do linfonodo poplíteo foram destinados à punção aspirativa. O procedimento anestésico teve duração média de 40 a 50 minutos. Animais idosos não foram incluídos, devido ao risco de bradicardia. Durante todo o procedimento, os animais foram acompanhados por médico veterinário, sendo monitorados os reflexos interdigital e palpebral, bem como a frequência cardíaca. O uso da atropina como MPA, evita os efeitos parassimpatomiméticos da xilazina. Após o procedimento de coleta, os animais foram observados durante a recuperação por 50 a 60 minutos.

Para os cães LV positivos, foi realizada uma nova coleta de sangue para separação de células PBMC e cultivo celular, com processamento máximo em 48 horas.

5.1.3 Diagnóstico para a leishmaniose visceral

O diagnóstico para LV foi realizado com os seguintes ensaios:

- a) Exame clínico: Observação dos sinais apresentados, seguindo a ficha de avaliação clínica (APÊNDICE A).
- b) Exame parasitológico: Pesquisa de *Leishmania* spp. realizados em aspirado medular ou de linfonodo. A coleta do material foi realizada por um médico veterinário treinado, participante da pesquisa. Do material obtido foram confeccionados esfregaços em seis lâminas, examinadas em microscópio óptico para pesquisa das formas amastigotas (BRASIL, 2007, 2014).
- c) Exame sorológico para LV: A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* em sangue foi realizada utilizando o teste rápido imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos/FIOCRUZ de acordo com as instruções contidas no kit. As amostras de soro foram submetidas ao ELISA pelo kit Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, segundo o fabricante.
- d) PCR em tempo real: Para extração de DNA utilizamos o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Para a detecção de *L. infantum*, foi usado o sistema LINF 1B, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do Complexo *L. donovani* (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009).

5.1.4 Grupos de estudo

Os grupos de estudo foram definidos conforme um conjunto de critérios descritos a seguir:

- a) Sintomáticos: animais com histórico epidemiológico compatível, com características clínicas e dois ou mais testes diagnósticos positivos para LV (PCR em tempo real - qPCR, sorologia e exame parasitológico);
- b) Assintomáticos: animais com histórico epidemiológico compatível, sem características clínicas e dois ou mais testes diagnósticos positivos para LV (PCR em tempo real (qPCR), sorologia, exame parasitológico);

- c) Grupo controle: animais com ou sem histórico epidemiológico compatível, sem sinais clínicos, negativos para todos os testes realizados.

5.2 Obtenção dos antígenos recombinantes

O grupo de Pesquisas em Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, do Departamento de Microbiologia do IAM FIOCRUZ-PE, foi responsável pela produção da proteína quimérica (Q1) (SANTOS, 2015) e dos antígenos recombinantes Lci10 (MAGALHÃES, 2007) e Lci13 (CAMPOS, 2007), cuja informações encontram-se sob proteção intelectual (INPI – PI0900961-2; data do depósito – 23/03/2009). As proteínas foram obtidas após os procedimentos de clonagem, expressão dos genes codificantes e purificação por cromatografia de afinidade. Amostras das proteínas purificadas foram quantificadas por meio de diluições seriadas e comparação com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Os tamanhos foram confirmados em gel de poliacrilamida Dodecil-sulfato de Sódio (ou *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*- SDS-PAGE), e, em seguida, foram destinadas para os ensaios em células caninas.

5.3 Obtenção das frações antigênicas de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas (cepa MHOM/TN/1980/IPT1) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (SIGMA) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 1000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C. O sedimento resultante foi ressuspensionado em salina tamponada (PBS – pH 7,2 - 1mL/1x10⁹ parasitas), acrescentando 10µL de *Phenylmethyl-Sulfonyl Floride* (PMSF) a cada 1ml de solução. A massa foi submetida a processos de congelamento em nitrogênio líquido (\pm -197°C) e descongelamento em banho-maria (\pm 40°C), e em seguida foram ultrassonicadas (30 segundos/ 40W), por seis vezes e centrifugadas a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e coletado, aliquoteado e estocado a -80°C. A fração antigênica solúvel de *L. (L.) infantum* foi obtida através do sobrenadante. A dosagem protéica foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Após esses procedimentos, a fração antigênica foi armazenada a -80°C até a utilização nos ensaios de cultura celular.

5.4 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) e cultivo celular

Ao sangue heparinizado foi adicionado ao Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS - pH 7,2) na proporção de 1:2. A esta mistura foi então adicionado ao Ficoll-hypaque (proporção de 1:1) para obtenção do anel de PBMC após centrifugação (900 x g por 30 minutos a 25°C). As células foram lavadas por centrifugação (400 x g por 10 minutos a 25°C) duas vezes em PBS estéril (pH=7,2) (1:2), e o pellet celular contendo as células mononucleares foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado (soro bovino fetal-SBF a 10%), sendo posteriormente contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante de viabilidade Azul de Trypan. As células foram depositadas em placas de 24 poços de poliestireno (1x10⁶ células/poço) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF na presença e ausência dos estímulos antigênicos em estufa de CO₂ a 37°C durante tempo de cultivo estabelecido após cinética.

5.5 Padronização da cinética de tempo *versus* concentração

Cães positivos para LV foram selecionados para estabelecer o tempo ótimo de cultivo para detecção das citocinas através de estímulo com diferentes concentrações dos antígenos (Q1, Lci10 e Lci13). Total de 1x10⁶ células em 1mL de cultura foi depositado em uma placa de 24 poços e estimulado com fitohemaglutinina (phytohemagglutinin – PHA) (5µg/mL), com antígenos recombinantes Q1, Lci10 e Lci13 (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL); antígeno solúvel de *L. infantum* (10 µg/mL e 25µg/mL) (CHAMAKH-AYARI et al., 2014; PINELLI et al., 1994; ROATT et al., 2012; SALDARRIAGA et al., 2006) e sem nenhum estímulo (controle negativo). As placas foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂ por 24h, 48h e 72h. A escolha do melhor tempo de cultivo e concentração antigênica foi avaliada através da expressão gênica das citocinas IFN-γ; TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10 e TGF-β por reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa (RT-qPCR).

5.6 Avaliação da expressão de RNA mensageiro para citocinas

5.6.1 Extração de RNA por TRIzol[®]

A partir de células PBMC dos cães, o RNA total foi extraído utilizando-se protocolo para amostras em TRIzol[®] (Invitrogen). Após a adição de 200µL de clorofórmio, o lisado foi

homogeneizado vigorosamente, incubado a temperatura ambiente por 15min e centrifugado a 11.000 rpm a 4°C por 15min. A fase aquosa foi removida para um novo tubo e adicionou-se a mesma proporção de álcool isopropílico (aproximadamente 400µL). A amostra foi incubada à -20°C por 10min e depois centrifugada a 11.000 rpm a 4°C por 15min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1mL de etanol 75% e a amostra foi centrifugada a 6.400 rpm à 4°C por 5min. Por fim, o sobrenadante foi descartado e pellet de RNA deixado secar. O pellet foi ressuspendido em 30µL de água contendo *diethylpyrocarbonate* concentração de 0,2%(DEPC), e armazenado a -80°C.

5.6.2 Transcrição reversa para cDNA

Após a obtenção do RNA, foi realizada a transcrição reversa em cDNA, utilizando-se o kit *TaqMan Reverse Transcription reagentes* (Applied Biosystems), que contém a enzima *multiscribe reverse transcriptase* (50U/µL), inibidor de RNase (20 U/µL), mix de dNTPs (10mM), *primers* randômicos (50µM), tampão de reação (10X RT Buffer) e solução de cloreto de magnésio (MgCl₂-25mM). As condições de ciclagem utilizadas seguiram as instruções do fabricante (25°C/10min; 37°C/30min; 95°C/5min; 4°C/∞). Após dosagem da concentração das amostras em espectrofotômetro, foi realizada a RT-qPCR.

5.6.3 Quantificação da Expressão gênica das citocinas por RT-qPCR

O cDNA foi utilizado para quantificar a expressão das citocinas IFN-γ (ID: Cf02623316_m1 – 117pb); TNF (ID: Cf02691119_s1 – 137pb) e IL-2 (ID: Cf02623318_m1 – 107pb) para o perfil Th1 e IL-4 (ID: Cf02623271_s1 – 110pb); IL-10 (ID: Cf02624264_m1 – 114pb) e TGF-β (ID: Cf02623326_m1 – 124pb) para o perfil Th2 por PCR em tempo real (Sistema *TaqMan*[®]) através do sistema de detecção de seqüências ABI-PRISM 7500 e usando o kit *TaqMan*[®] *Gene Expression PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Como controle endógeno da reação foi utilizada o Dog GAPDH (ID: Cf04419463_gh – 54pb) (Applied Biosystems).

Após normalização das amostras com o controle endógeno, a expressão relativa (*Relative quantitation* - RQ) do mRNA foi calculada pelo método do *Ct* comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), conforme descrito por Schmittgen e Livak em 2008 onde o $\Delta\Delta Ct$ foi calculado conforme representado na figura 4. O *Ciclo Threshold* (*Ct*) é definido como o ciclo da PCR em que o sinal de

fluorescência cruza um limite, na sua fase exponencial de amplificação, indicando que houve detecção dos fluorocromos (SCHIMITTGEN;LIVAK, 2008). O método do Ct comparativo consiste em fazer suposições incluindo que a eficiência da PCR é perto de 1 e que a eficiência do gene alvo é similar à do gene utilizado como controle endógeno. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e expressas com a média \pm desvio-padrão.

Figura 4- Fórmula para calcular o $\Delta\Delta Ct$ e obter a expressão relativa (RQ) do mRNA do gene alvo.

$$\Delta\Delta Ct = [\text{AMOSTRA A (Ct gene de interesse - Ct do controle endógeno)} - \text{AMOSTRA B (Ct gene de interesse - Ct do controle endógeno)}]$$

Fonte: Schmittgen e Livak, 2008 (Tradução nossa)

Nota: Esta fórmula é utilizada para comparar a expressão gênica de genes em duas amostras diferentes, onde cada amostra é relacionada com o controle endógeno.

Legenda: Ct – Ciclo *Threshold*; RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.7 Análise dos dados

A análise da cinética foi realizada através da expressão relativa do mRNA das citocinas em estudo, após normalização das amostras com o controle endógeno pelo método do Ct comparativo.

Após o teste de normalidade utilizado Kolmogorov–Smirnov, para as amostras que obtiveram padrão normal foi utilizado o teste *t* de Student (paramétrico) e para as amostras com padrão não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (não-paramétrico). A correlação entre as citocinas foi realizada através do teste de Spearman, para amostras não normais e o teste de Pearson para amostras normais. Todos os testes foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc. 2007, San Diego, CA, USA), sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.8 Considerações éticas

Os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos (APÊNDICE B).

O projeto foi submetido e aprovado (nº 76/2014) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IAM/FIOCRUZ-PE (ANEXO A) e com termo aditivo aprovado válido até 31 de março de 2019 (ANEXO B).

6 RESULTADOS

6.1 Padronização da cinética tempo *versus* concentração

Para que todos os antígenos fossem avaliados em uma mesma condição, foi realizado uma coleta de sangue de 03 cães positivos para LV, com quadro clínico semelhante, os quais estão apresentados no Quadro 2. A partir desta coleta, foi realizado um *pool* de células e plaqueamento. Os cães sintomáticos estavam em estágio inicial da doença, considerados oligossintomáticos, portanto com perfil similar aos assintomáticos, o que não influencia na análise dos dados. Os critérios para a classificação dos cães foram descritos no tópico 5.1.4.

Quadro 2-Cães provenientes da cidade de Caruaru-PE, utilizados para a cinética de tempo vs concentração dos novos antígenos recombinantes (Lci10, Lci13 e Q1).

Cães <i>pool</i> de células	Classificação Clínica	Diagnóstico
C1	Assintomático	Parasitológico (-) ELISA (+) RIFI (+)
C2	Sintomático	Parasitológico (+) ELISA (+) RIFI (+)
C3	Sintomático	ELISA (+) RIFI (+)
Replicatas Biológicas*		
A1	Sintomático	Parasitológico (+) DPP (+) ELISA (+)
A3	Assintomático	Parasitológico (-) DPP (+) ELISA (+)
A4	Sintomático	Parasitológico (+) DPP (+) ELISA (+)

Fonte: A autora.

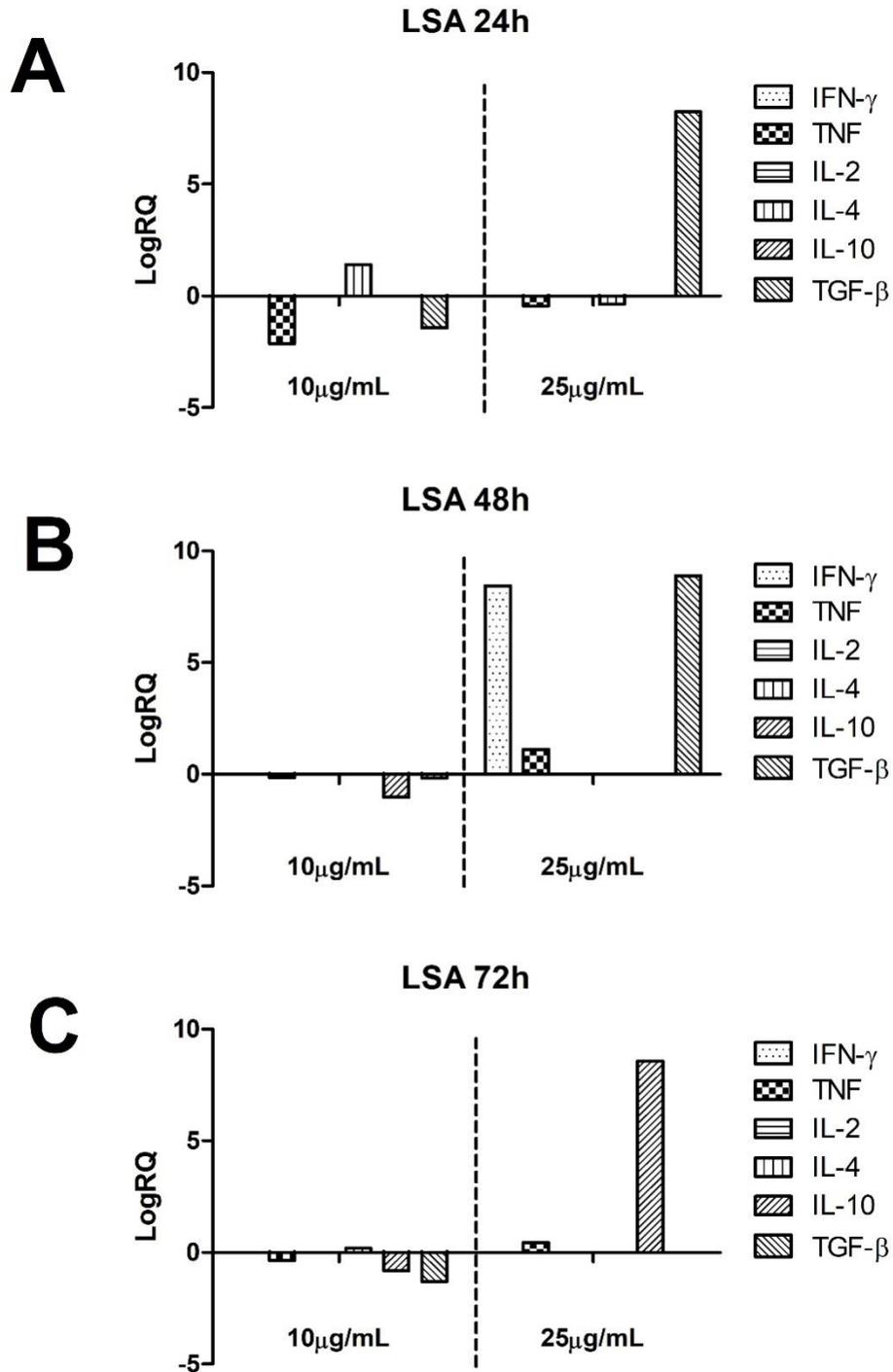
Nota: * Cães utilizados para repetição da Lci10 na concentração de 5µg/mL.

Legenda: Para classificar os cães em assintomáticos ou sintomáticos foram seguidos os critérios descritos no tópico 5.1.4. DPP: Plataforma *Dual Path* (Teste rápido imunocromatográfico); ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*.

6.1.1 Antígeno Solúvel de *L. infantum* bruto (LSA)

As duas concentrações foram testadas nos tempos de 24h (figura 5-A), 48h (figura 5-B) e 72h (figura 5-C). Na concentração de 25µg/mL, houve expressão tanto de citocinas do perfil Th1 como do perfil Th2, em todos os tempos estudados. No entanto, as citocinas Th2 foram mais evidenciadas, levando a um perfil de susceptibilidade (Figura 6). Os valores da quantificação relativa das citocinas estão descritos na tabela 1.

Figura5- Visão geral da cinética tempo vs concentração do LSA nas concentrações de 10µg/mL e 25 µg/mL.



Fonte: A autora

Legenda: Cultivo de PBMC de cães com LVC nostempos de cultivo: (A) 24h, (B) 48h, (C) 72h estimuladas nas concentrações de 10 µg/mL e 25 µg/mL de LSA. Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

Tabela 1- Valores da quantificação relativa ($\text{Log}RQ$) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com o LSA nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (10 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$).

Tempo de Cultivo	Log RQ^*					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	10	25	10	25	10	25
Citocina						
IFN- γ	0	0	0	8,44	0	0
TNF	-2,13	-0,49	-0,15	1,12	-0,35	0,45
IL-2	0	0	0	0	0	0
IL-4	1,41	-0,37	0	0	0,19	0
IL-10	0	0	-1,03	0	-0,83	8,56
TGF- β	-1,43	8,25	-0,17	8,89	-1,29	0

Fonte: a autora

Nota: *Quantificação relativa expressa em análise logarítmica.

6.1.2 Antígeno Recombinante Lci10

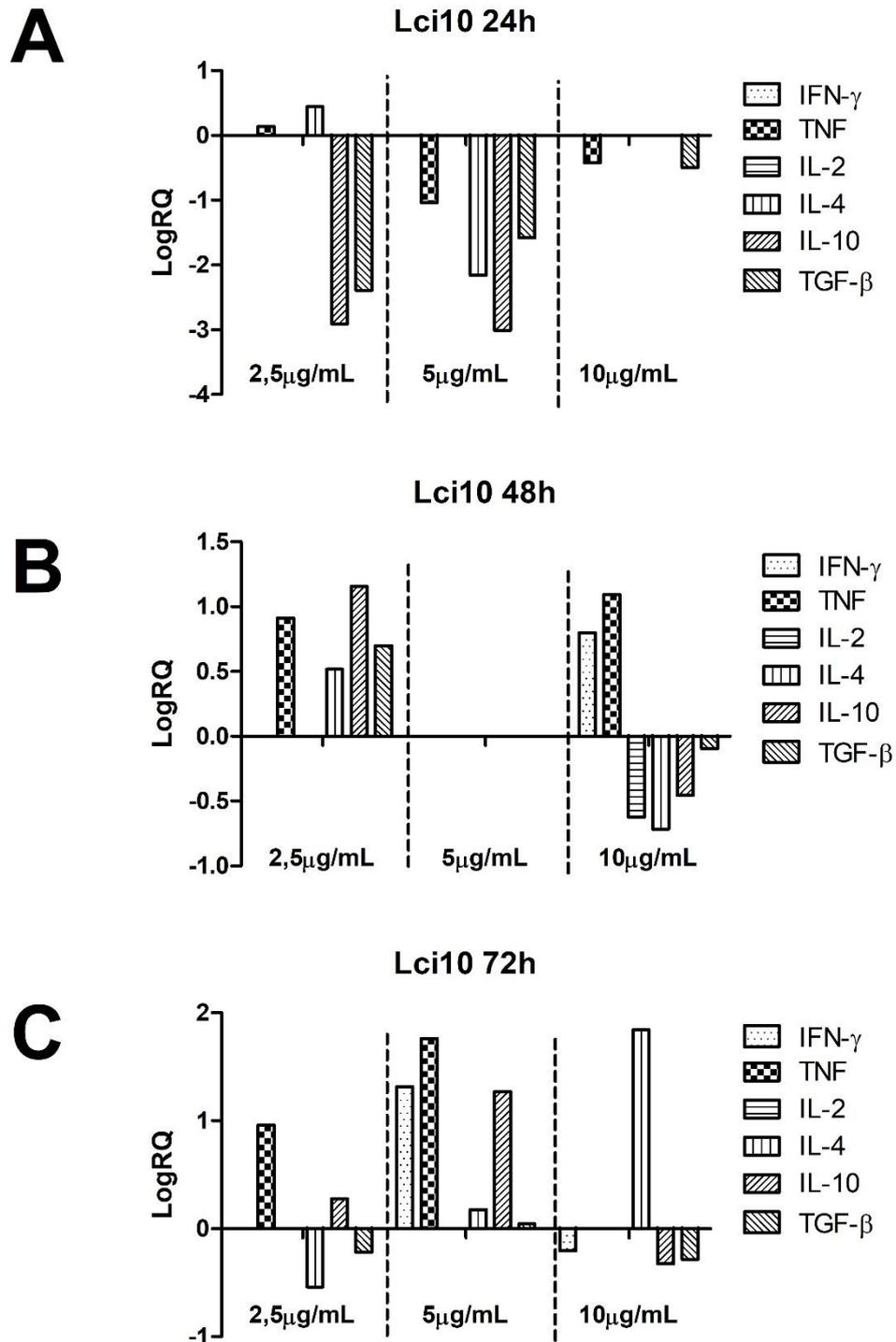
Os resultados para a Lci10 estão apresentados na figura 6e as respectivas RQ s na tabela 2. Pode-se observar que utilizando 2,5 $\mu\text{g/mL}$, após 72h de cultivo, existe uma tendência para maior expressão de TNF ($\text{Log}RQ= 0,96$), com supressão da expressão das citocinas IL-4 ($\text{Log}RQ= -0,54$) e TGF- β ($\text{Log}RQ= -0,22$) o que aponta para uma resposta protetora.

Para a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ não houve expressão para as citocinas analisadas em 48h de cultivo, devido a falha na amplificação do controle endógeno responsável pela normalização das amostras em teste. Desta forma, para correta interpretação dos dados nesta concentração, foi necessária uma repetição da cinética. Para esta repetição foram utilizados três animais separadamente, com as mesmas condições do teste anterior, na forma de replicata biológica.

Utilizando 10 $\mu\text{g/mL}$, em 48h de cultivo houve supressão da resposta Th2 para as citocinas IL-4 ($\text{Log}RQ= -0,72$), IL-10 ($\text{Log}RQ= -0,46$) e TGF- β ($\text{Log}RQ= -0,09$), e expressão positiva para as citocina IFN- γ ($\text{Log}RQ= 0,79$) e TNF ($\text{Log}RQ= 1,09$).

Analisando comparativamente 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em 72h e 10 $\mu\text{g/mL}$ em 48h; observou-se melhor desempenho para a Lci10 com 10 $\mu\text{g/mL}$ em 48h.

Figura 6-Panorama geral da cinética da Lci10, com as concentrações utilizadas (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: a autora

Legenda: *Pool* de células nos tempos de cultivo 24h (A), 48h (B), 72h (C) estimuladas nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL de Lci10. Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

Tabela 2- Valores da quantificação relativa (LogRQ) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Lci10 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$).

Tempo de cultivo	Log RQ*								
	24 horas			48 horas			72 horas		
Citocina \ Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10
INF- γ	0	0	0	0	0	0,79	0	1,32	-0,20
TNF	0,14	-1,04	-0,42	0,91	0	1,09	0,96	1,76	0
IL-2	0	0	0	0	0	-0,62	0	0	0
IL-4	0,44	-2,16	0	0,52	0	-0,72	-0,54	0,18	1,84
IL-10	-2,91	-3,01	0	1,16	0	-0,46	0,28	1,27	-0,32
TGF- β	-2,39	-1,58	-0,49	0,69	0	-0,09	-0,22	0,05	-0,28

Fonte: a autora

Legenda: *Quantificação relativa expressa em análise logarítmica.

6.1.2.1 Repetição para Lci10 5 $\mu\text{g/mL}$

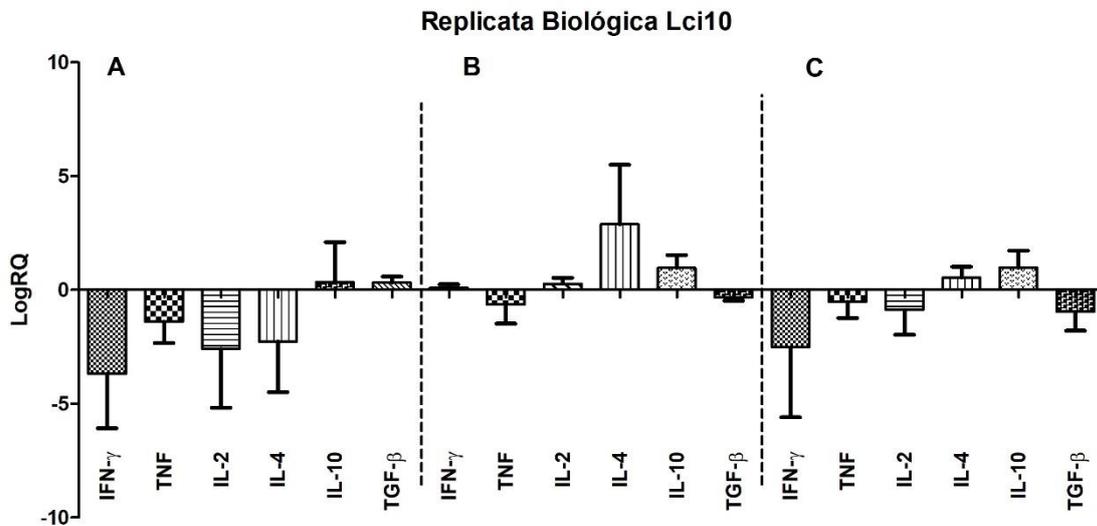
Os resultados da média da expressão gênica para as citocinas analisadas após o estímulo com Lci10 (5 $\mu\text{g/mL}$) estão apresentados na Figura 7 e os valores da quantificação relativa (LogRQ) descritos na Tabela 3. Em 24h de cultivo houve supressão da resposta Th1, com maior estímulo na expressão de citocinas do perfil Th2, IL-10 ($\text{LogRQ}= 0,35$) e TGF- β ($\text{LogRQ}= 0,33$).

Em 48h, há um indício de expressão das citocinas IFN- γ ($\text{logRQ}= 0,01$) e IL-2 ($\text{LogRQ}= 0,19$), indicando que houve um reestímulo do perfil Th1, porém, com maior expressão para o perfil Th2, IL-4 ($\text{LogRQ}= 1,89$), IL-10 ($\text{LogRQ}= 1,98$) e TGF- β ($\text{LogRQ}= 0,39$).

Em 72h há novamente uma diminuição da expressão das citocinas no perfil Th1, e expressão positiva para IL-4 ($\text{LogRQ}= 0,55$), e IL-10 ($\text{LogRQ}= 0,98$).

Observou-se que a Lci10 possui uma capacidade de reestímulo ao perfil Th1, em 48h de cultivo.

Figura 7- Panorama geral da replicata biológica da cinética da Lci10 com a concentração de 5 µg/mL nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: a autora

Legenda: Média da expressão das citocinas após estímulo com Lci10 na concentração de 5µg/mL em (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h. Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

Tabela 3- Média da quantificação relativa (LogRQ) da expressão das citocinas após o estímulo com 5 µg/mL da Lci10 nos tempos de 24, 48 e 72h.

Tempo de cultivo	Log RQ*		
	24 horas	48 horas	72 horas
Concentração (µg/mL)	5	5	5
Citocina			
IFN- γ	-3,68	0,01	-2,50
TNF	-1,38	-0,52	-0,51
IL-2	-2,59	0,19	-0,87
IL-4	-2,26	1,89	0,55
IL-10	0,35	1,98	0,98
TGF- β	0,33	0,39	-0,96

Fonte: a autora

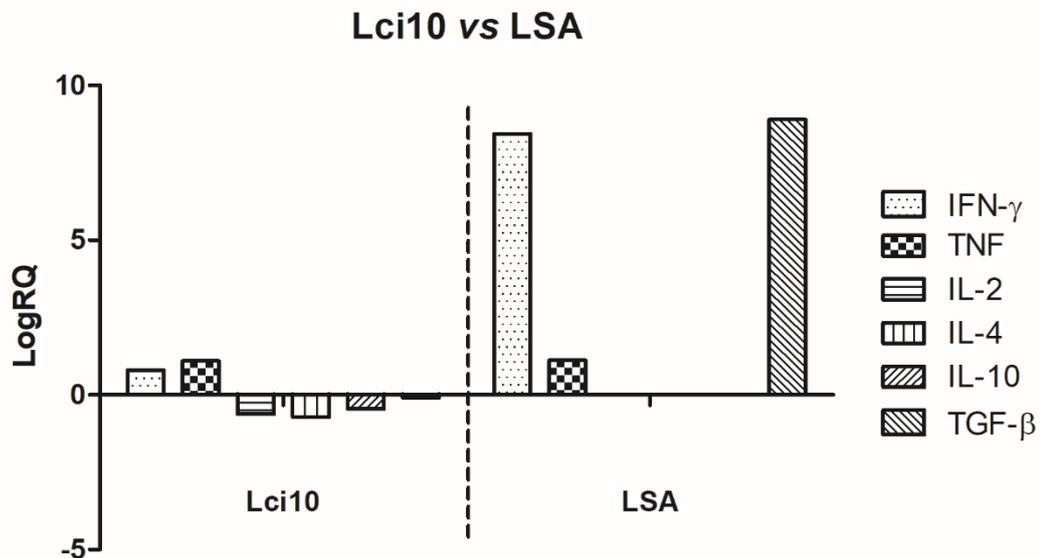
Legenda: *Média da quantificação relativa expressa em análise logarítmica.

6.1.2.2 Comparação entre a melhor concentração da Lci10 e LSA

O antígeno bruto LSA foi comparado com o recombinante nas condições em que foi apresentado o melhor desempenho para ambos; 25µg/mL (LSA) e 10µg/mL (Lci10) em 48h de cultivo (figura 8). Pode-se observar que apesar de uma menor expressão para as citocinas do perfil protetor (Th1) após o estímulo com a Lci10 (IFN- γ LogRQ= 0,79 e TNF- α LogRQ=

1,09), este antígeno é capaz de suprimir a resposta deletéria (Th2), o que não ocorre após o estímulo com o LSA (TGF- β Log RQ = 8,89).

Figura 8- Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Lci10 e LSA no tempo de 48h.



Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

6.1.3 Antígeno recombinante Lci13

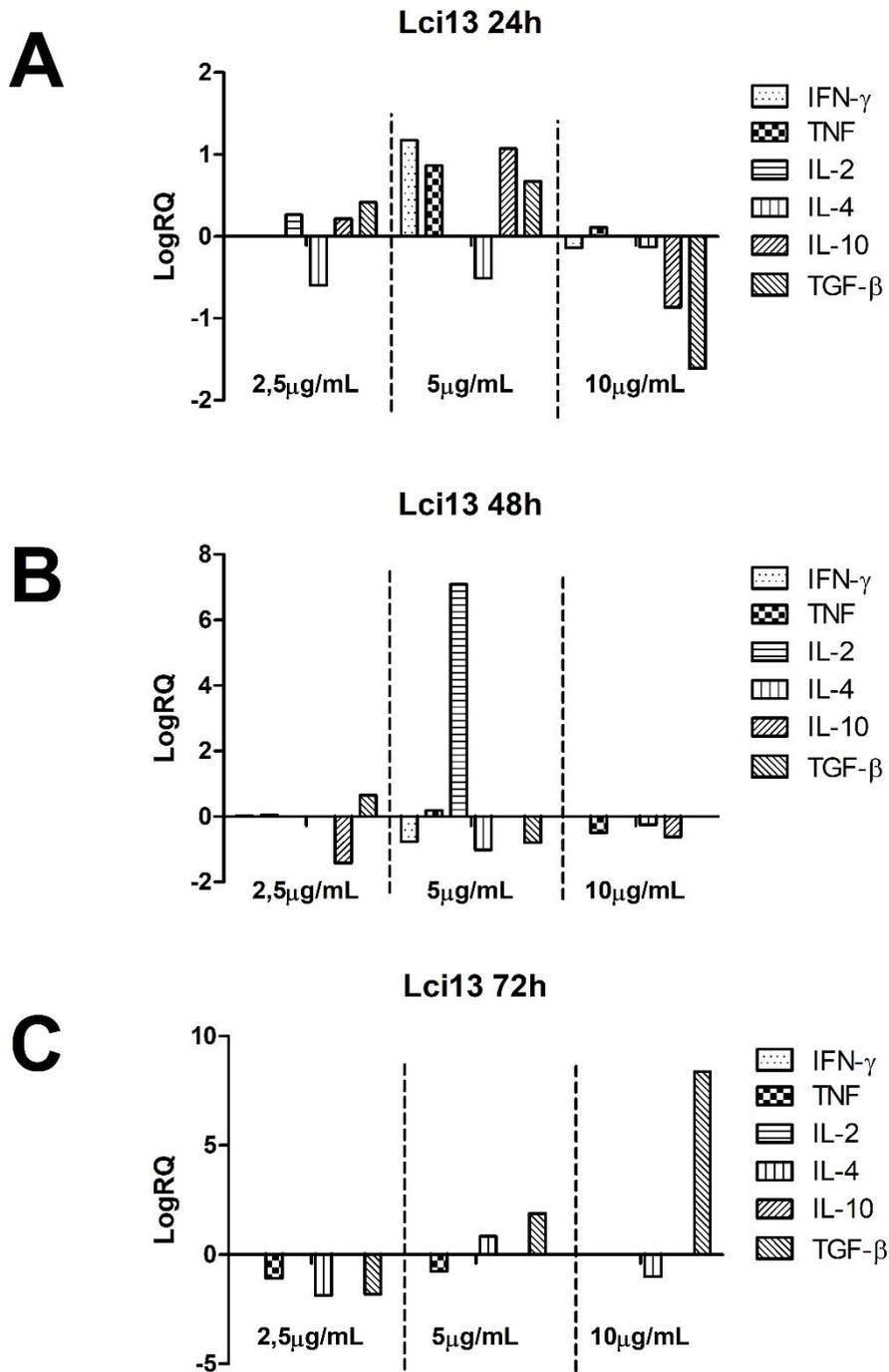
Os resultados para a Lci13 estão apresentados na figura 9e os respectivos valores das RQ s estão descritos na tabela 4.

Na concentração de 2,5 μ g/mL em 24h de cultivo, há uma pequena expressão para IL-2 (Log RQ = 0,27), porém, as citocinas do perfil Th2, IL-10 (Log RQ = 0,21) e TGF- β (Log RQ = 0,42) apresentaram-se com expressão superior em todos os tempos estudados.

Na concentração de 5 μ g/mL, em 24h, podemos observar que há um balanço entre os perfis Th1 e Th2, com um maior síntese das citocinas IFN- γ (Log RQ = 1,18) e TNF (Log RQ = 0,87), regulação com IL-10 (Log RQ = 1,07), expressão negativa para IL-4 (Log RQ = -0,51) e baixa expressão de TGF- β (Log RQ = 0,67). Em 48h, houve uma elevada expressão de IL-2 (Log RQ = 7,08), porém houve uma supressão do IFN- γ (Log RQ =-0,76) e supressão da resposta Th2. Em 72h há expressão apenas de citocinas do perfil Th2.

Utilizando 10 μ g/mL, podemos observar que há uma supressão de citocinas tanto do perfil Th1, quanto do Th2 em praticamente todos os tempos estudados. Apenas em 72h, vemos uma expressão de TGF- β (Log RQ = 8,38).

Figura 9-Panorama geral da cinética da Lci13, com as concentrações utilizadas(2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: a autora

Legenda: *Pool* de células nos tempos de cultivo 24h (A), 48h (B), 72h (C) estimuladas nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL de Lci13. Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

Tabela 4-Valores da quantificação relativa ($\text{Log}RQ$) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Lci13 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$).

Tempo de cultivo	Log RQ *								
	24 horas			48 horas			72 horas		
	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10
Citocina									
INF- γ	0	1,18	-0,14	0,03	-0,76	0	0	0	0
TNF	0	0,87	0,11	0,05	0,19	-0,50	-1,09	-0,77	0
IL-2	0,27	0	0	0	7,08	0	0	0	0
IL-4	-0,60	-0,51	-0,13	0	-1,02	-0,25	-1,87	0,85	-1,01
IL-10	0,21	1,07	-0,87	-1,42	0	-0,62	0	0	0
TGF- β	0,42	0,67	-1,61	0,65	-0,79	0	-1,82	1,88	8,38

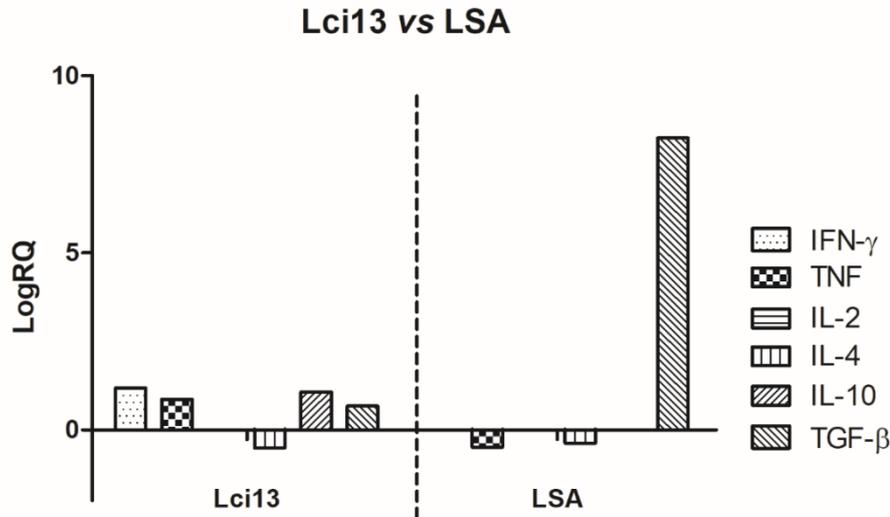
Fonte: a autora

Legenda: * Quantificação relativa expressa em análise logarítmica.

6.1.3.1 Comparação entre a melhor concentração da Lci13 e LSA

Quando comparamos a melhor concentração da Lci13 (5 $\mu\text{g/mL}$) com a melhor concentração do LSA (25 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 24h, é possível perceber que o estímulo com a proteína recombinante induz a síntese de citocinas do tipo Th1 regulado por citocinas do tipo Th2; em contraste com o perfil Th2 observado pelo LSA (figura 10).

Figura 10-Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Lci13 e LSA no tempo de 24h.



Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

6.1.4 Antígeno recombinante Q1

Os resultados da expressão gênica para as citocinas analisadas após estímulo com a proteína quimérica Q1 estão apresentados na figura 11 e suas respectivas RQ s descritas na tabela 5.

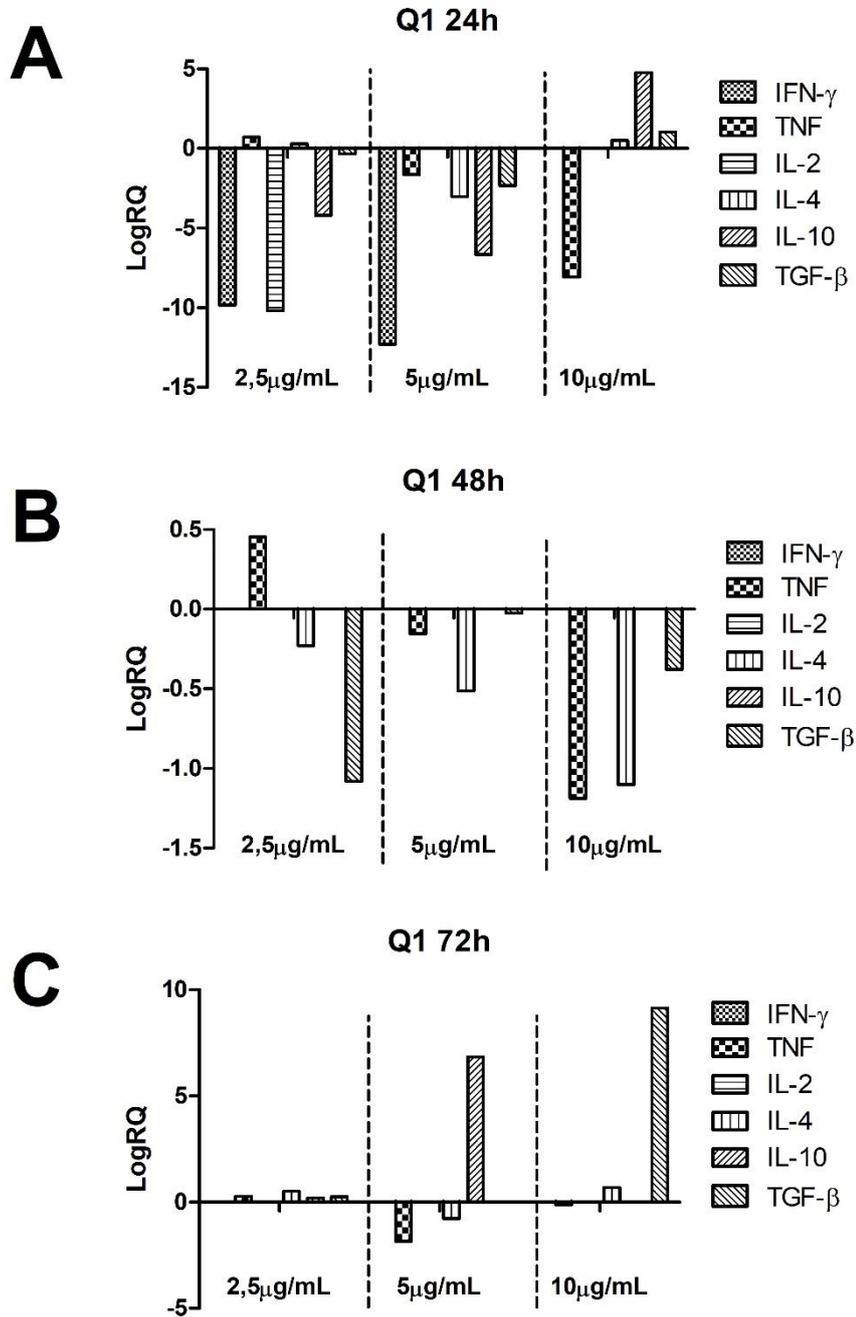
Na concentração de 2,5 μ g/mL após 24h de cultivo, os resultados apontam uma forte expressão negativa para IFN- γ ($\text{LogRQ} = -9,83$) e IL-2 ($\text{LogRQ} = -10,18$); em 48h houve uma sinalização de um equilíbrio nessa expressão, com a expressão de TNF ($\text{LogRQ} = 0,45$) e a supressão apenas da resposta, com a expressão negativa das citocinas IL-4 ($\text{LogRQ} = -0,23$) e TGF- β ($\text{LogRQ} = -1,08$). Após 72h, o maior estímulo passa a ser para o perfil de citocinas do tipo Th2.

Na concentração de 5 μ g/mL, observamos uma expressão negativa para as citocinas em praticamente todos os tempos de cultivo, com uma alta expressão de IL-10 ($\text{LogRQ} = 6,84$) em 72h, indicando que nessa concentração não foi possível estabelecer um equilíbrio.

Utilizando 10 μ g/mL, em todos os tempos de cultivo, destaca-se a expressão para as citocinas do perfil Th2 com supressão da resposta Th1.

Sendo assim, na concentração de 2,5 μ g/mL no tempo de 48hna qual foi observado o aumento da resposta Th1 e supressão da Th2 .

Figura 11- Panorama geral da cinética da Q1, com as três concentrações estimuladas (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: a autora

Legenda: *Pool* de células nos tempos de cultivo 24h (A), 48h (B), 72h (C) estimuladas nas concentrações de 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL da Q1. Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

Tabela 5-Valores da quantificação relativa ($\text{Log}RQ$) da expressão gênica para as citocinas após estímulo com a Q1 nos seus respectivos tempos (24, 48 e 72h) e concentrações (2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$).

Tempo de cultivo	$\text{Log}RQ^*$								
	24 horas			48 horas			72 horas		
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10
Citocina									
INF- γ	-9,83	-12,29	0	0	0	0	0	0	0
TNF	0,71	-1,63	-8,0,5	0,45	-0,15	-1,19	0,28	-1,84	-0,12
IL-2	-10,18	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-4	0,29	-3,03	0,50	-0,23	-0,51	-1,10	0,52	-0,76	0,69
IL-10	-4,19	-6,67	4,76	0	0	0	0,19	6,84	0
TGF- β	-0,34	-2,33	1,04	-1,08	-0,03	-0,38	0,26	0	9,14

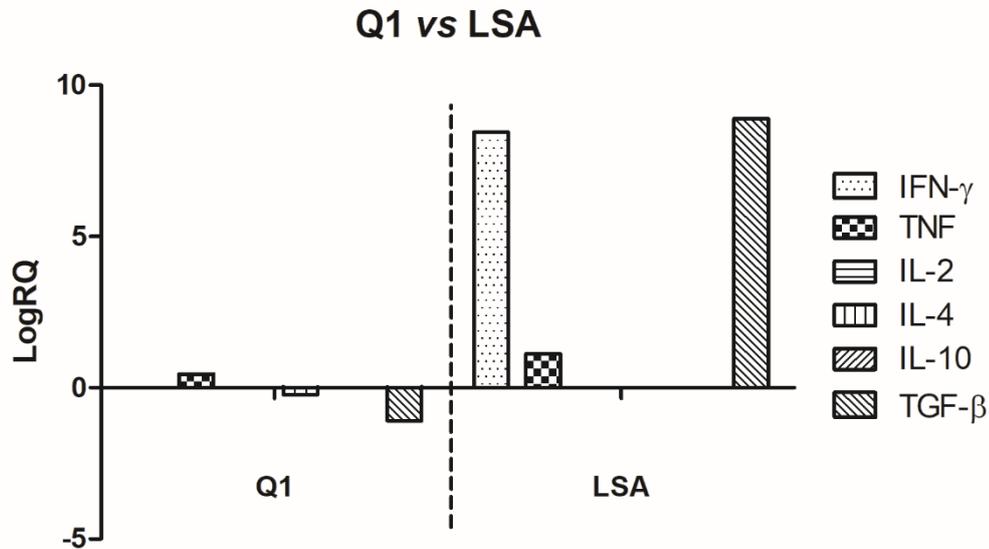
Fonte: a autora

Legenda: * Quantificação relativa expressa em análise logarítmica.

6.1.4.1 Comparação entre a melhor concentração da Q1 e LSA

Com uma análise comparativa entre a Q1 (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e o LSA (25 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 48h, observa-se que a resposta Th1 com expressão do TNF ($\text{Log}RQ= 0,45$) é inferior a resposta Th1 após estímulo pelo LSA com expressão do IFN- γ ($\text{Log}RQ= 8,44$) e TNF ($\text{Log}RQ= 1,12$)(figura 12). Porém, a Q1 foi capaz de suprimir a resposta Th2 com a expressão negativa das citocinas IL-4 ($\text{Log}RQ= -0,23$) e TGF- β ($\text{Log}RQ= -1,08$), o que não ocorre após o estímulo com o LSA (TGF- β $\text{Log}RQ= 8,89$).

Figura 12- Comparação entre a expressão para as citocinas analisadas após estímulo com os antígenos Q1 e LSA no tempo de 48h.



Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

6.1.5 Comparação dos três antígenos testados Lci10, Lci13 e Q1

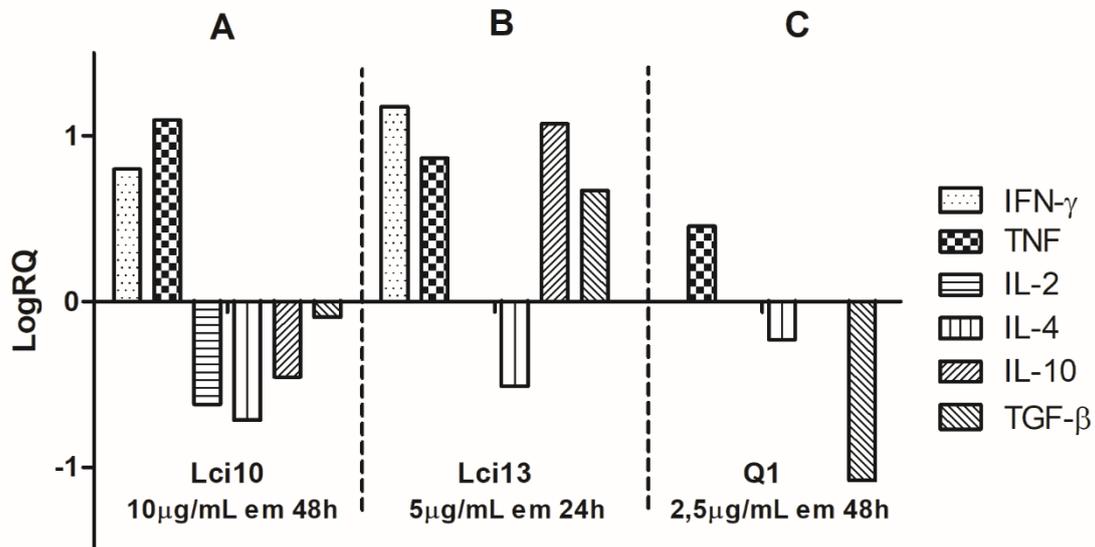
Após análise separadamente de cada antígeno, comparamos os três, conforme demonstrado na figura 13.

A Lci10 utilizada na concentração de 10 μ g/mL em 48h, foi capaz de suprimir a resposta Th2, com expressão negativa para as citocinas IL-4 (LogRQ= -0,72), IL-10 (LogRQ= -0,46) e TGF- β (LogRQ= -0,09), quando comparada a Lci13 na concentração de 5 μ g/mL em 24h, que apresentou apenas uma supressão de IL-4 (LogRQ= -0,51) e a Q1na concentração de 2,5 μ g/mL em 48h com supressão da IL-4 (LogRQ= -0,23) e TGF- β (LogRQ= -1,08).

Porém, A Lci13 demonstrou uma maior expressão das citocinas do perfil Th1 com IFN- γ (LogRQ= 1,18) e TNF (LogRQ= 0,87), quando comparada a Lci10 com a expressão de IFN- γ (LogRQ= 0,79) e TNF (LogRQ= 1,09) e a Q1 com a expressão de apenas TNF- α (LogRQ= 0,45). Em relação a IL-2 houve expressão negativa após estímulo com a Lci10 (LogRQ= -0,62), enquanto que para a Lci13 e para a Q1 não houve expressão.

Partindo do critério de comparação com o LSA, descrito nos itens 6.2.2.2, 6.2.3.1 e 6.2.4.1, a Lci13 apresentou uma melhor expressão das citocinas do perfil Th1, do que a Lci10 e a Q1, quando comparados com o LSA na concentração de 25 μ g/mL nos tempos ótimos de cultivo para cada antígeno. Deste modo a Lci13, foi o antígeno escolhido para dar continuidade ao estudo.

Figura 13- Comparação entre os antígenos Lci10, Lci13 e Q1 em suas melhores concentrações e tempos de cultivo.



Fonte: a autora

Legenda: (A) Melhor tempo e concentração da Lci10, 10 μ g/mL em 48h, demonstrando uma expressão positiva para IFN- γ e TNF, e expressão negativa para IL-4, IL-10 e TGF- β ; (B) Melhor tempo e concentração da Lci13, demonstrando um equilíbrio na expressão das citocinas dos perfis Th1/Th2; (C) Melhor tempo e concentração da Q1, com expressão positiva para TNF e supressão de IL-4 e TGF- β . Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), onde o controle (amostra sem estímulo) é igualado a zero, e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa.

6.2 Avaliação da Lci13 nos grupos de estudo

Foram selecionados 19 cães, a partir dos critérios descritos no item 5 (tópico 5.1.4), e descritos no quadro 3, sendo 7 cães para o grupo controle (CTRL), 7 cães para o grupo sintomático (S) e 5 cães para o grupo assintomático (AS). Os cães tiveram o PBMC estimulado com a Lci13 na concentração de 5 μ g/mL e no tempo de cultivo de 24h, escolhido através da cinética, e todos foram comparados com o LSA (25 μ g/mL em 24h). As citocinas avaliadas foram IFN- γ , TNF, IL-10 e TGF- β .

Quadro 3-Classificação dos cães nos grupos de estudo de acordo com os critérios descritos no tópico 5.1.4.

ANIMAL	EPIDEMIOLOGIA	DIAGNÓSTICO			CLASSIFICAÇÃO
		PARASITOLÓGICO	SOROLÓGICO**	qPCR	
A10	Compatível	Negativo	Positivo	Positivo	Sintomático
A12	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A13	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A14	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A15	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A17	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A18	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A20	Não compatível	Negativo	Negativo	Negativo	Controle
A21	Compatível	Positivo	Positivo	Positivo	Sintomático
A22	Compatível	Positivo	Positivo	Negativo*	Assintomático
A23	Compatível	Não realizado***	Positivo	Positivo	Sintomático
A24	Compatível	Não realizado***	Positivo	Positivo	Sintomático
A26	Compatível	Negativo	Positivo	Negativo*	Assintomático
A27	Compatível	Não realizado***	Positivo	Negativo*	Assintomático
A28	Compatível	Positivo	Positivo	Positivo	Sintomático
A29	Compatível	Positivo	Positivo	Negativo*	Assintomático
A30	Compatível	Positivo	Positivo	Negativo*	Sintomático
A31	Compatível	Não realizado***	Positivo	Negativo*	Sintomático
A32	Compatível	Negativo	Positivo	Negativo*	Assintomático

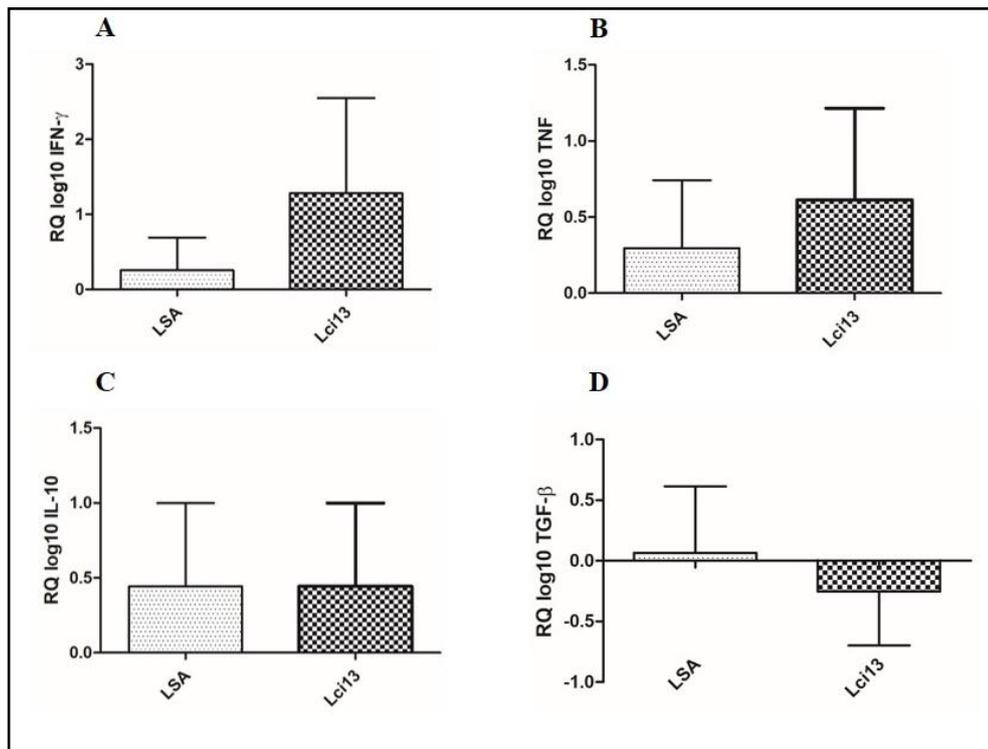
Fonte: a autora

Legenda: (*) As amostras foram consideradas negativas devido a carga parasitária detectada ser inferior a 2×10^6 fg de DNA de *L. infantum* (~1 parasita, de acordo com Grimaldi et al 2014); (**) Os testes sorológicos incluem a realização do DPP, como teste de triagem e do ELISA como teste confirmatório; (***) Material insuficiente para a realização do teste.

6.2.1 Grupo controle

Fazendo uma análise descritiva da média da expressão das citocinas nos 7 cães do grupo controle, após o estímulo com a Lci13, para o IFN- γ (figura 14-A), podemos perceber uma expressão maior no grupo estudado, quando comparado ao LSA. O mesmo é observado para TNF (figura 14-B). A IL-10 (figura 14-C) foi observada com uma mesma expressão do LSA e houve a supressão do TGF- β (figura 14-D). Em todas as análises, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o LSA e a Lci13. Os valores das médias e o *p-Value* das análises estão expressos na tabela 6.

Analisando a correlação entre as citocinas (tabela 7), observa-se uma correlação positiva entre IFN- γ e TNF ($p=0,042$) e INF- γ e IL-10 ($p=0,049$); no entanto, o aumento dessas citocinas não tem correlação com a diminuição do TGF- β .

Figura 14-Expressão gênica das citocinas em cães do grupo controle após estímulo com a Lci13.

Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), com média \pm desvio padrão, onde a amostra sem estímulo é igualado a zero (calibrador da reação), e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa. (A) Média dos valores da expressão da citocina IFN- γ ; (B) Média dos valores da expressão da citocina TNF; (C) Média dos valores da expressão da citocina IL-10 e (D) Média dos valores da expressão da citocina TGF- β . LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*.

Tabela 6- Média dos valores das RQs por citocinase *p-Value* do grupo controle.

CITOCINAS	LSA	Lci13	<i>p-Value</i>
IFN- γ	0,25	1,28	0,3186
TNF	0,29	0,61	0,3829
IL-10	0,44	0,44	0,9482
TGF- β	0,06	-0,25	0,3374

Fonte: A autora

Legenda: Valores das médias das RQs expressas em análise logarítmica (log na base 10). LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*; Lci13: antígeno recombinante testado. *P-Value* < 0,05 é significativo. Intervalo de confiança 95%.

Tabela 7- Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo controle.

Citocinas						
Lci13	IFN- γ x TNF	IFN- γ x IL-10	IFN- γ x TGF- β	TNF x IL-10	TNF x TGF- β	IL-10 x TGF- β
<i>p-Value</i>	0,04*	0,04*	0,72	0,04*	0,47	0,80
<i>r</i>	0,77	0,75	-0,16	0,77	-0,32	-0,11

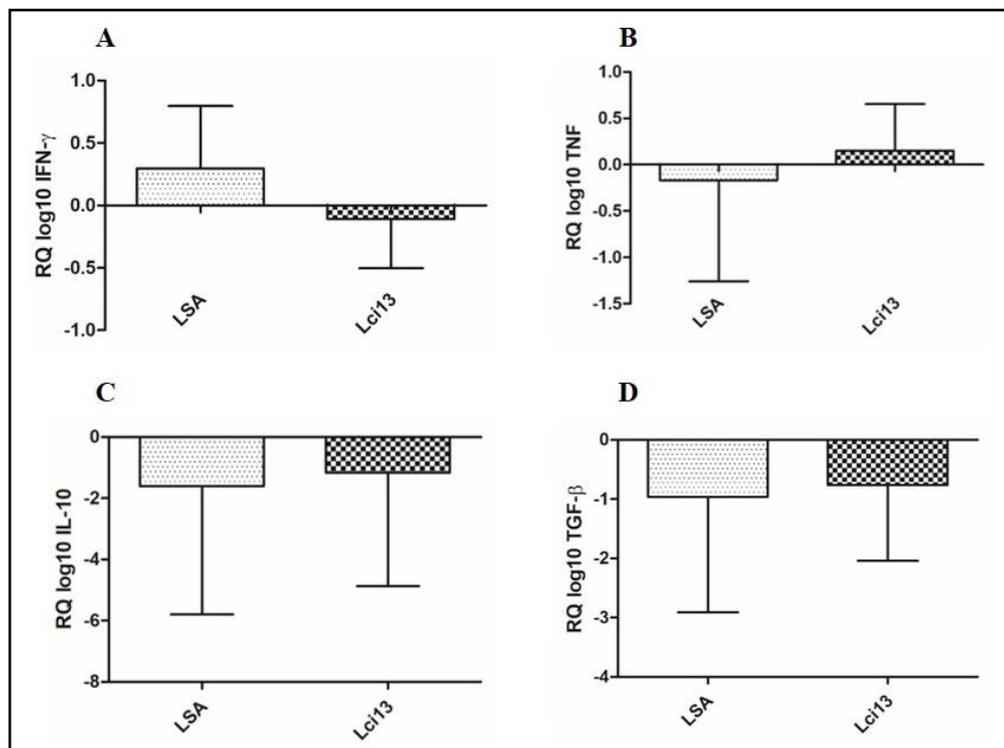
Fonte: A autora

Legenda: Valores correspondentes a correlação, expressos nos valores de *p-value* e da correlação de Pearson (*r*). O * representa a diferença estatística com o valor de *p* < 0,05.

6.2.2 Grupo sintomático

Para o grupo sintomático, foi possível observar em uma análise descritiva que o IFN- γ (figura 15-A) demonstrou uma pequena supressão quando comparada ao LSA. O TNF (figura 15-B) apresentou uma expressão positiva e houve a supressão de IL-10 (figura 15-C) e TGF- β (figura 15-D). Em todas as análises, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Os valores das médias e do *p-Value* estão expressos na tabela 8. Não houve correlação significativa entre as citocinas estudadas (tabela 9).

Figura 15-Expressão gênica das citocinas em cães do grupo sintomático após estímulo com a Lci13.



Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), com média \pm desvio padrão, onde a amostra sem estímulo é igualado a zero (calibrador da reação), e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa. (A) Média dos valores da expressão da citocina IFN- γ ; (B) Média dos valores da expressão da citocina TNF; (C) Média dos valores da expressão da citocina IL-10 e (D) Média dos valores da expressão da citocina TGF- β . LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*.

Tabela 8- Média dos valores das RQs por citocinas e *p-Value* do grupo sintomático.

CITOCINAS	LSA	Lci13	<i>p-Value</i>
IFN-γ	0,29	-0,10	0,1192
TNF	-0,17	0,15	0,4936
IL-10	-1,60	-1,17	0,8979
TGF-β	-0,96	-0,76	0,9490

Fonte: A autora

Legenda: Valores das médias das RQs expressas em análise logarítmica (log na base 10). LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*. *P-Value*<0,05 é significativo. Intervalo de confiança 95%.

Tabela 9-Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo sintomático.

Citocinas						
Lci13	IFN-γ x TNF	IFN-γ x IL-10	IFN-γ x TGF-β	TNF x IL-10	TNF x TGF-β	IL-10 x TGF-β
<i>p-Value</i>	0,23	0,23	0,45	0,35	0,68	0,51
<i>r_s</i>	-0,03	-0,52	-0,63	0,41	0,00	0,52

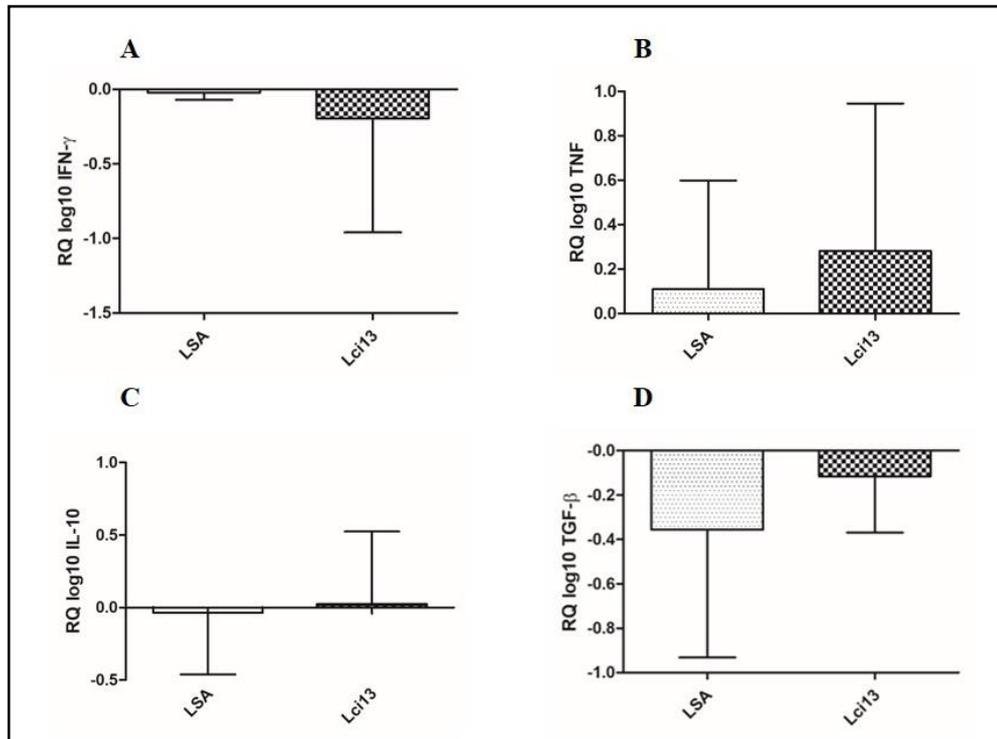
Fonte: A autora

Legenda: Valores correspondentes a correlação, expressos nos valores de *p-value* e da correlação de Spearman (*r_s*).

6.2.3 Grupo assintomático

Analisando de forma descritiva o grupo assintomático foi possível observar que houve uma expressão positiva para as citocinas TNF (figura 16-B), maior quando comparada com o LSA; a IL-10 mostrou um pequeno aumento de expressão (figura 16-C). Já o IFN- γ (figura 16-A) e TGF- β (figura 16-D), apresentaram expressões negativas em relação ao LSA. Em todas as análises, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Os valores das médias e do *p-Value* estão expressos na tabela 10. Não houve correlação significativa entre as citocinas estudadas (tabela 11).

Figura 16-Expressão gênica das citocinas em cães do grupo assintomático após estímulo com a Lci13.

Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), com média \pm desvio padrão, onde a amostra sem estímulo é igualado a zero (calibrador da reação), e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa. (A) Média dos valores da expressão da citocina IFN- γ ; (B) Média dos valores da expressão da citocina TNF; (C) Média dos valores da expressão da citocina IL-10 e (D) Média dos valores da expressão da citocina TGF- β . LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*; Lci13.

Tabela 10- Média dos valores das RQs por citocinase *p*-Value do grupo assintomático.

CITOCINAS	LSA	Lci13	<i>p</i> -Value
IFN- γ	-0,02	-0,19	0,7972
TNF	0,11	0,28	0,6532
IL-10	-0,03	0,02	0,8487
TGF- β	-0,35	-0,12	0,4189

Fonte: A autora

Legenda: Valores das médias das RQs expressas em análise logarítmica (log na base 10). LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*. *P*-Value<0,05 é significativo. Intervalo de confiança 95%.

Tabela 11- Correlação entre as citocinas produzidas após estímulo com a Lci13 no grupo assintomático.

Citocinas						
Lci13	IFN- γ x TNF	IFN- γ x IL-10	IFN- γ x TGF- β	TNF x IL-10	TNF x TGF- β	IL-10 x TGF- β
<i>p</i> -Value	0,23	0,23	0,45	0,35	0,68	0,51
<i>r</i> _s	0,67	0,67	0,44	0,60	-0,30	0,40

Fonte: A autora

Legenda: Valores correspondentes a correlação, expressos nos valores de *p*-value e da correlação de Spearman (*r*_s).

6.2.4 Comparação entre os grupos de estudos para a Lci13

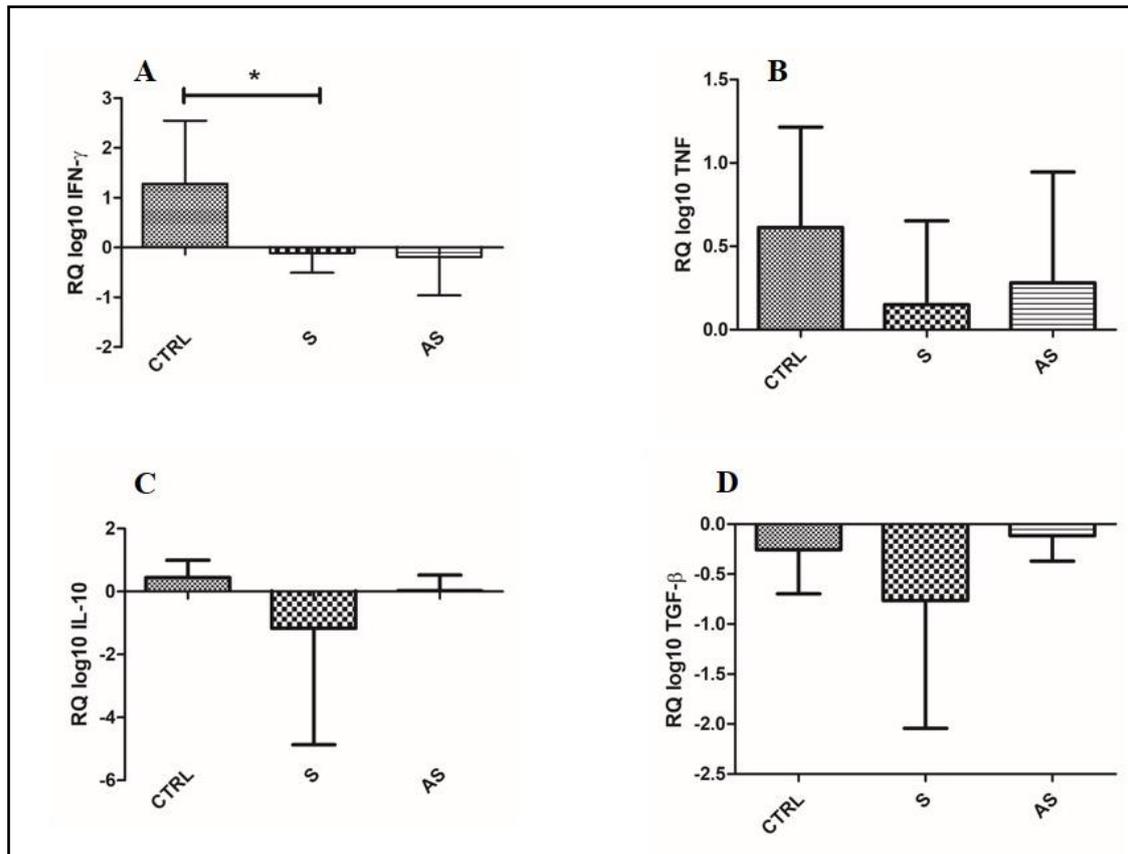
Após a análise individual de cada grupo de estudo, foi feita a comparação entre os três grupos por citocina. As análises estatísticas foram feitas da seguinte maneira: 1- Controle vs Sintomático; 2- Controle vs Assintomático e 3- Sintomático vs Assintomático. Na figura 17-A foi observado que apenas a amostra controle obteve uma expressão positiva para IFN- γ , onde houve uma diferença estatística significativa quando comparamos o grupo controle com o grupo sintomático ($p= 0,0282$). A comparação entre o grupo controle com o grupo assintomático e o grupo sintomático com o grupo assintomático não obtiveram diferenças estatísticas significativas.

O TNF (figura 17-B) foi expresso positivamente em todos os grupos estudados, no entanto, apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos de cães avaliados.

A IL-10 (figura 17-C) foi suprimida no grupo sintomático e expressa positivamente nos grupos controle e assintomático. Porém, não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos.

Na figura 17-D, foi observada a expressão negativa do TGF- β , sugerindo uma supressão da resposta Th2, mas também não verificamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de cães avaliados.

Figura 17-Expressão gênica das citocinas dos grupos estudados após estímulo com a Lci13.



Fonte: a autora

Legenda: Os valores são expressos em análise logarítmica (Log na base 10), com média \pm desvio padrão, onde a amostra sem estímulo é igualado a zero (calibrador da reação), e os demais valores são expressos de forma positiva ou negativa. (A) Média dos valores da expressão da citocina IFN- γ ; (B) Média dos valores da expressão da citocina TNF; (C) Média dos valores da expressão da citocina IL-10 e (D) Média dos valores da expressão da citocina TGF- β . LSA: Antígeno Solúvel de *L. infantum*; CTRL: controle; S: Sintomático; AS: Assintomáticos. (*) p -Value= 0,0282.

7 DISCUSSÃO

Estudos indicam que a resistência à infecção por *Leishmania infantum* LVC, se dá por uma forte resposta Th1, principalmente pelo aparecimento do IFN- γ , responsável pelo estímulo a proliferação celular. Esta citocina, juntamente com o TNF, são responsáveis pela ativação de macrófagos e outras células do sistema imune no combate ao parasito (COSTA-PEREIRA et al., 2015; MATRILIS et al., 2016; RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016; SCHAUT et al., 2016). A citocina IL-2 auxilia a eficiência dos linfócitos citotóxicos, e juntamente com IFN- γ e TNF, desencadeiam uma resposta protetora para o cão (LEAL et al., 2014).

A IL-10, está relacionada ao aumento dos sinais clínicos da LVC (CAVALCANTI et al., 2015; RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016). Ela também é capaz de atuar sobre várias células do sistema imune, incluindo as células apresentadoras de antígenos (APC) e células T, sendo capaz de suprimir a capacidade das APC sem estimular células T, através da remoção de sinais co-estimulatórios (KLING et al., 2013). No entanto, essa citocina conhecida por estar presente no perfil Th2 e por contribuir para a susceptibilidade da doença, também pode atuar modulando negativamente o efeito pró-inflamatório do IFN- γ (ALVES et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

O TGF- β tem uma função similar à IL-10 na supressão das APCs tendo sua expressão aumentada em cães sintomáticos (KLING et al., 2013; LEAL et al 2014). Alves et al. (2009) sugeriram que o bloqueio de TGF- β e a estimulação de IFN- γ e TNF, pode ser um grande passo para protocolos vacinais eficientes. Isso corrobora com os resultados observados em nossos ensaios, no qual essas características foram encontradas.

A avaliação dos ensaios *in vitro* de cultivo de PBMC para estabelecimento do desempenho dos antígenos em diferentes concentrações e em diferentes tempos de cultivo celular mostraram que os antígenos testados foram capazes de sinalizar a reversão da resposta Th2 para uma Th1, com o aumento da expressão de citocinas como IFN- γ e TNF. A Lci10(10 μ g/mL em 48h) demonstrou uma expressão de IFN- γ e TNF positivas e, IL-2 com expressão inferior ao calibrador (amostra sem estímulo com LogRQ= 0). A supressão da resposta Th2, também foi observada em nossos resultados, indicando uma expressão negativa para IL-4, IL-10 e TGF- β . Estes resultados sugerem a utilização da Lci10 como um candidato a imunomodulador ou vacina terapêutica. No entanto, uma expansão do número amostral de cães deve ser realizada.

Assim como a Lci10, a Q1 (2,5µg/mL em 24h de cultivo) obteve resultados satisfatórios no que diz respeito à capacidade de induzir um estímulo protetor, uma vez que diminuiu a expressão de IL-10 e TGF-β, e apresentou uma expressão positiva de TNF, portanto, sendo considerada uma proteína imunogênica.

Para a Lci13(5µg/mL em 24h), induziu um balanço entre os perfis Th1/Th2, com uma maior expressão de IFN-γ e TNF. Visto que o estímulo foi realizado em células de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, o aumento dos níveis destas citocinas sugerem um aumento na proliferação celular, o que levaria a uma modulação na resposta, favorecendo o combate a infecção.

A resposta do tipo Th1 é imprescindível para o controle da multiplicação da *Leishmania* e precisa ser modulada por citocinas do tipo Th2, para minimizar a exacerbação dos mecanismos pró-inflamatórios induzidos pelas citocinas IFN e TNF, as quais podem causar danos tissulares e explicar as manifestações mais graves da doença. Cães assintomáticos e pacientes humanos considerados curados dos sintomas clínicos, apresentam os dois perfis de respostas imunes (GHOSH et al., 2002; MICHELIN et al., 2011; REIS et al., 2009; SRIVASTAVA et al., 2016). Este foi um ponto a considerar a escolha do antígeno nascinéticas realizadas.

A presença dos dois perfis foi observada nos testes com o antígeno A2 em camundongos infectados com *L. donovani*. Neste caso foi possível identificar que o estímulo com este antígeno e a coexistência de Th1/Th2, induziram uma resposta humoral reduzindo a internalização de formas amastigotas por macrófagos (GHOSH et al., 2002). Em nosso estudo, apenas a Lci13 apresentou essas características, com uma maior expressão para o perfil protetor quando comparada ao LSA. Além disso, essa proteína foi capaz de suprimir a IL-4, responsável pela formação de imunocomplexos e agravamento do quadro da LVC (COSTA-PEREIRA, et al., 2015; MICHELIN et al., 2011). Dessa forma, este foi o antígeno escolhido para continuar os ensaios com os grupos de animais do estudo.

Os cães incluídos nos três grupos de estudo foram selecionados através de testes diagnósticos já consagrados pela literatura, além do exame clínico, crucial para a definição dos grupos. É importante esclarecer que os cães dos grupos sintomáticos e assintomáticos foram considerados semi-domiciliados, ou seja, retornavam a residência apenas para alimentação, permanecendo a maior parte do tempo nas ruas. Essas condições podem aumentar as chances de má nutrição e doenças associadas, explicando a variabilidade nos valores mínimos e máximos dos nossos dados.

Segundo estudo realizado por Guedes et al. (2016), de 31 cães analisados por eles, 14,28% possuíam coinfeção com *Dirofilária* e 57,16% possuíam coinfeção com Cinomose. Para minimizar ao máximo esse viés de seleção, cães que apresentaram *Dirofilariose* e Cinomose, infecções bastante comuns em cães e que alteram a homeostase imunológica foram excluídos das análises.

Os cães assintomáticos representam de 20 a 40% da população soropositiva para LVC (MICHELIN et al., 2011), tornando difícil o reconhecimento até mesmo pelos seus proprietários/cuidadores. Diante disso, há uma maior dificuldade de encontrar cães com essa classificação clínica, já que muitos desses evoluem para a cura espontânea dos sintomas. No entanto, estes animais continuam sendo reservatórios silenciosos da LVC (MARTINS et al., 2015). Esses dados corroboram com nossa busca ativa, na qual, dos 19 cães que participaram do estudo, apenas 5 foram assintomáticos.

No nosso estudo, o antígeno recombinante Lci13, demonstrou um bom desempenho em estimular a resposta Th1, por aumentar a expressão de IFN- γ e TNF, responsáveis por auxiliarem no combate a infecção por *L. infantum*. Esse fato foi mais evidente quando estimulamos o PBMC dos cães controle. Apesar de não haver diferença estatística, foi possível observar diferenças na expressão das citocinas nos cães testados com a Lci13 comparado com o LSA no nosso estudo. Nos cães sintomáticos e assintomáticos, o TNF conseguiu modular a resposta com um aumento da sua expressão, no entanto o IFN- γ não obteve uma expressão positiva.

Outro ponto importante a ressaltar é que nos cães do grupo controle, foi possível identificar a correlação positiva entre o aumento de IFN- γ e TNF após o estímulo com a Lci13. Segundo Reis et al. (2010) presença destas citocinas em testes com PBMCs, aumentaram a produção de fatores anti-leishmania, assim como a proliferação de células CD4+, CD8+ e células B, auxiliando no combate a infecção por *L. infantum*. Tanto no grupo controle quanto no grupo assintomático foi possível observar a presença da IL-10 após o estímulo da Lci13. Estes resultados sugerem um possível contrabalanço da resposta imune auxiliando no controle da infecção.

Nos cães sintomáticos, foi observado uma supressão de IL-10, tanto no LSA, quanto após estímulo com Lci13. Esse resultado corrobora com os obtidos por Carrillo e Moreno (2009), esses autores sugerem que, mesmo esta citocina por muitas vezes possa estar associada à susceptibilidade da doença, geralmente em cães sintomáticos, ela apresenta-se em baixos níveis, aumentando apenas quando a infecção é tardia (CARRILLO et al., 2007).

Quinnell et al. (2001) sugerem que a IL-10 pode ser regulada independentemente, em comparação com outras citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-13, sugerindo assim que na ausência dessas, a IL-10 estaria associada ao agravamento dos sintomas clínicos da LVC. No entanto, o papel da IL-10 ainda é contraditório em cães com LVC (BOGGIATTO et al., 2010; RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016; PINELLE et al., 1999).

A supressão da citocina TGF- β , observada em todos os grupos testados, pode sugerir uma redução do perfil susceptível, já que essa citocina está presente em cães sintomáticos, associada ao agravamento dos sintomas clínicos e aumento da parasitemia.

Dentro do estudo genético de Antígenos Leucocitários Caninos (*Dog Leukocyte Antigen – DLA*), correspondente ao complexo de histocompatibilidade (MHC) em cães, alguns resultados vêm demonstrando a relação entre o DLA de classe II e a susceptibilidade a infecção por *L. infantum* (HOUSEIN et al 2017).Além disso, a presença de polimorfismos e mutações nessas moléculas que podem contribuir para a variabilidade gênica dentro da resposta imune nos cães com LVC(HOUSEIN et al 2017; QUINNELL et al., 2003).Foi demonstrado que, receptores *Toll-Like* (TLR) podem induzir citocinas inflamatórias no combate a infecções. Dessa forma, alterações nesses receptores pode deixar o cão susceptível. Contudo, os estudos sobre a relação dos TLR's e a LVC ainda estão em andamento (CUSCÓ et al., 2014; HOUSEIN et al., 2017).Isso pode explicar o fato de haver um desvio padrão alto entre as amostras testadas no nosso estudo, já que a genética individual de cada cão pode influenciar diretamente no estado do sistema imune e na maneira como esses animais respondem às infecções.

Analisando de forma descritiva, apesar do alto desvio padrão e de não haver diferença estatística nos testes utilizados, a Lci13 se mostrou um antígeno promissor. Assim, são necessários mais estudos referentes a sua imunogenicidade. Em acréscimo, o aumento do número de animais por grupos de estudo pode interferir diretamente nessa questão. A partir destes resultados, testes pré-clínicos são necessários para consolidar a eficácia deste antígeno recombinante para os ensaios vacinais. No entanto, não invalidamos a utilização da Q1 e da Lci10 como possíveis candidatos promissores.

8 CONCLUSÕES

O LSA foi capaz de induzir uma melhor expressão das citocinas de perfil Th2 na concentração de 25µg/mL, sendo esta a escolhida para análise comparativa com os novos antígenos, simulando assim uma infecção natural.

O antígeno Lci13 (5µg/mL em 24h) apresentou os melhores resultados em comparação à Lci10(10µg/mL em 48h) e Q1(2,5µg/mL em 48h), por induzir um equilíbrio entre as respostas Th1/Th2 promovendo uma regulação da resposta imune, quando comparado com o LSA. Por esta razão, este antígeno foi escolhido para seguir com análise nos grupos de estudo.

Nas análises em grupos de estudo, a Lci13 obteve excelente desempenho no grupo controle, sugerindo um bom candidato a uma vacina profilática.

Não descartamos a hipótese da utilização da Lci13 como imunomodulador, já que houve uma tendência de regulação da resposta no grupo assintomático.

Esse trabalho foi capaz fornecer subsídios científicos quanto a imunogenicidade do antígeno recombinante testado (Lci13), abrindo espaço para novas pesquisas no desenvolvimento de uma vacina profilática.

9 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos se faz necessário aumentar o n amostral dos grupos de cães estudados ou seguir para testes *in vivo* em modelo murino, em que as condições sejam controladas para evitar viés de resposta, e assim, poder consolidar o antígeno como um bom candidato vacinal.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. B. H. et al. comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, p. 1631-1639, 2004.
- ALMEIDA, B. F. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, p. 6– 12, 2013.
- ALVAR, J. et al. The Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.5, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-g, TNF-a, IL-10 and TGF-b in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, p. 349–358, 2009.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 35, p. 699-705, 2010.
- AYRES, M. et al. **BIOESTAT e Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Ed. Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis - A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 1, p.14-15, 2007.
- BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine immunity revealed early type-2 and late type-1 profiles during active cutaneous leishmaniasis and predominance of type-1 pattern in naturally resistant individuals. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 12, p. 839-849, 2007.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, p. 329–337, 2006.
- BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clinical and vaccine immunology**, Washington, v.17, n. 2, p. 267–273, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica N° 038/2014/DFIP/SDA**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Brasília, DF, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da LV**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 5 jul. 2016b.

BRIANTI, E. et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin(4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London v. 327, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-327>>. Acesso em: 20 jan 2017.

CAMPOS, R. M. **Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da Leishmaniose visceral**. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

CARCELÉN, J. et al. The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, Kidlington, n. 27, p. 5964–5973, 2009.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, London, n. 182, p. 109–118, 2015.

CARNEIRO-DE-FREITAS, J. C. et al. Leishmanioses: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.7, n.3, p.193-204, 2013.

CARRILLO, E. et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, Kidlington, n. 25, p. 1534–1543, 2007.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, p. 67–70, 2009.

CASTRO NETO, A. **Avaliação da importância de novas proteínas antigênicas de *Leishmania infantum* para a viabilidade celular**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

CAVALCANTI, A. S. et al. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania infantum*-Naturally Infected Dogs. **PLoS ONE**, San Francisco v. 10, n.4, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123009>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

CHAMAKH-AYARI, R. et al. *In Vitro* Evaluation of a Soluble *Leishmania* Promastigote Surface Antigen as a Potential Vaccine Candidate against Human Leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 5, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092708>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

- CHAOUCH, M. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 198, n.1-2, p. 78-84, 2013.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London v. 5, p. 873–882, 2007.
- CONHEÇA a leishmaniose. Teresina, 6 abr 2012. Disponível em: <https://www.apipa10.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2395&Itemid=315>. Acesso em 10 jan. 2017.
- CONVIT, J. et al. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 97, p. 469-472, 2003.
- CORTESE, L. et al. Regulatory T cells, Cytotoxic T lymphocytes and a TH1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Research in Veterinary Science**, London, n. 95, p. 942–949, 2013.
- CORTESE, L. et al. An immune-modulating diet increases the regulatory T cells and reduces T helper 1 inflammatory response in Leishmaniasis affected dogs treated with standard therapy. **BioMed Central Veterinary Research**, London, v. 11, n. 295, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0610-7>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- COSTA-PEREIRA, C. et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, London, v. 11, p.92, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0397-6>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, London, v. 190, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.04.005>>. Acesso em: 24 mar. 2016
- CUSCÓ, A. et al. Non-synonymous genetic variation in exonic regions of canine Toll-like receptors. **Canine Genetics and Epidemiology**, London, n. 1, v. 11, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/2052-6687-1-11>>. Acesso em: 20 jan 2017.
- DE MORAIS, C. G. V. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/324915>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- DUARTE et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 49, n. 4, p. 398-407, 2016.
- ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.28, p.36-42, 2000.

FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, Kidlington, v. 32, p. 1287–1295, 2014.

FERREIRA, S. A. et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, n. 7, v. 4, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002150>>. Acesso em: 20 jan 2017.

FOROUGH-PARVAR, F; HATAM, G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, Cairo, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/569193>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

FRAGA, D. B. M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004333>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

FRANC, M. et al. Efficacy of a new combination of fipronil and permethrin (Effitix®) against *Phlebotomus perniciosus* in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2015. No prelo.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). **Manual de Rede de frio**. 3. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2001.

GENARO, O. et al. Phase III randomized double blind clinical trial on the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 116, 1996.

GHOSH, A. et al. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, Amsterdam n. 20, p. 59–66, 2002.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 149, p. 440–444, 2007

GOTO, H.; PRIANTI, M.G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 51, p. 241-246, 2009.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 208, p. 94-100, 2015.

GRIMALDI, G. et al. Clinical and Parasitological Protection in a *Leishmania infantum*-Macaque Model Vaccinated with Adenovirus and the Recombinant A2 Antigen. **PLOS**

Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 6, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002853>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

GUEDES, R. F. M. et al. Hematologic and biochemical differentiation of dogs infected with *Leishmania infantum*, *Babesia* spp., *Dirofilaria* spp. and Cinomosis virus. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 26, n. 3, p. 37-51, 2016.

HEZARJARIBI, H. Z. et al. Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of *Leishmania major* in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, New York, v.134, p. 341-348. 2013.

HOSEIN, S. et al. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. **Parasitology**, London, n. 144, p. 95–115, 2017.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, n. 422, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

KASZAK, I et al. Canine leishmaniasis – an emerging disease. **Annals of Parasitology**, Liverpool, n. 61, v. 2, p. 69–76, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 604–615, 2011.

KHADEM, F.; UZONNA, J. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, London, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 11, p. 105–111, 1997.

KLING, J. C.; KÖRNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 43, p. 417–425, 2013.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, London, v. 3, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://doi:10.1038/cti.2014.4>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

KUMAR, A.; SAMANT, M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control. **Parasite Immunology**, Oxford, n. 38, p. 273–281, 2016.

LEAL, G. G. A. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 205, p. 472–482, 2014.

LEAL, M.L. F. **Desenvolvimento tecnológico de vacinas em Bio- Manguinhos/ FIOCRUZ: uma proposta de gestão**. 2004. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão C&T em Saúde) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

LEISHMANIOSE canina. Disponível em: <<http://tudosobrecachorros.com.br/leishmaniose-canina/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

LÓPEZ-CÉSPEDES, A. et al. Leishmania spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2012, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1100/2012/945871>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MAGALHÃES, F. B. **Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana e canina**. 2007. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MARTINS, V. T. et al. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, San Francisco, n. 10, v. 9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137683>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas: Texto e Atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MATIN, M. J. et al. The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. **The Veterinary Journal**, London, n. 200, p. 410–419, 2014.

MAYRINK, W. et al. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 695–697, 1996.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, n. 39, v.1, p. 14-21, 2006.

MCGWIRE B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **The Quarterly journal of medicine**, Oxford, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

MENDONÇA, L. Z. et al. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 472, 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1186/s13071-016-1752-6>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 177, p. 39–49, 2011.

MICHELIN, A. F. et al. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 105, n. 5, p. 373–383, 2011.

MOHEBALI, M. et al. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, p. 4097–4100, 2004.

MORAIS, R. C. S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, p. 473-481, 2013.

MORENO, J. et al. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Fransisco, v. 6, n. 6, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001683>>. Acesso em: 20 jan 2017.

MORENO, J. et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 158, p. 199–207, 2014.

MORTAZAVIDEHKORDI, N. et al. Evaluation of a novel lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. **Parasite immunology**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 670-677, 2016.

NASCIMENTO, M. **Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *L. infantum* com potencial para uso diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral**. 2014. Tese (Doutorado em Genética) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, London, n. 202, p.425–435, 2014.

NUNES, J. B. et al. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 58, n. 75, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658075>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

OLIVA, G. et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Fransisco, v. 8, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003213>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, p.1025-1034, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniasis**. Geneva, 2010. (Série de Relatório técnico). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: **World Health Organization**. Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

OTRANTO, D. et al. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: longitudinal field study. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, p. 323–332, 2010.

OZBILGE, H. et al. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, London, n. 55, p. 1329–1331. 2006.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. **The Veterinary Journal**, London, v. 182, n. 2, p. 356–358, 2009.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, n. 69, 2012. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fimmu.2012.00069>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

PINELLE, E. et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 1 p. 229–235, 1994.

PINELLE, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, n. 69, p. 121–126, 1999.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, n. 183, p. 1421–1424, 2001.

QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, New York, n. 55, v. 1, p. 23–28, 2003.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, n. 51, p. 1425–1430, 2007.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 227, p. 98–114, 2016.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Cell Press. Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 341–349, 2010.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Rio de Janeiro: Olinda, 2003.

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, Urmia, v. 6, n. 1, p. 1 – 7, 2015.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanni, v. 2, n. 59, 2012. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fcimb.2012.00059>>. Acesso em: 28 set. 2016.

RIERA, S. La seguridad ha sido un aspecto prioritario en el desarrollo de LetiFend. **Revista Argos**, Porto, out. 2016. Disponível em: <<http://saludanimal.leti.com/wp-content/uploads/2016/10/Entrevista-Pilar-Brazis-Argos-Presentacion-vacuna-LETIFEND.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

ROATT, B.M. et al. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049780>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

ROATT, B. M. et al. Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers Immunology**, Lausanni, n. 8, p. 217, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00217>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

RODRIGUEZ-CORTEZ, A. et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155224>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

SABATÉA, D. et al. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 115, p. 56-63, 2014.

SAKAI, S.I. et al. Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN- γ production and protects mice from *Leishmania major* infection. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, p. 2207-2213, 2010.

SALDARRIAGA, O. A. et al. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, p. 1928-1940, 2006.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. Attenuated and Replication-Competent Vaccinia Virus Strains M65 and M101 with Distinct Biology and Immunogenicity as Potential Vaccine Candidates against Pathogens. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 12, p. 6955-6974, 2013.

SANTIAGO, M. E. B. et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Tropica**, Amsterdam, n. 127, p. 174-180, 2013.

SANTOS, W. J. T. **Otimização das condições para superexpressão em *Escherichia coli* de proteínas quiméricas com potencial para diagnóstico da leishmaniose visceral**. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

- SCHAUT, R. G. et al. Recovery of antigen-specific T cell responses from dogs infected with *Leishmania (L.) infantum* by use of vaccine associated TLR-agonist adjuvant. **Vaccine**, Kidlington, v.34, n.44, p. 5225-5234, 2016.
- SCHMITTGEM, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101 – 1108, 2008.
- SEVÁ, A.P. et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 7, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- SHAHBAZI, M. et al. Immunological comparison of DNA vaccination using two delivery systems against canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 212, p. 130–139, 2015.
- SILVA, K. L. O. et al. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 202, p. 313–318, 2014.
- SOCIEDADE MUNDIAL DE PROTEÇÃO AO ANIMAL. **Leishmaniose Visceral Canina: um manual para o clínico veterinário**. Rio de Janeiro, 2011.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 317, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1598-y>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, n. 9, v. 277, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology Cell Biology**, Adelaide, n. 85, p. 138–147, 2007.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R.A. Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002278>>. Acesso em: 20 jan 2017.
- SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Current Molecular Medicine**, Netherlands, v.4, p. 667-679, 2004.
- TRIGO, J. et al. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. **Vaccine**, Amsterdam, n. 28, v. 19, p. 3333–3340, 2010.
- ULIANA, S. R. B. et al. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology Cambridge University**, London, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0031182016002523>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- WYLIE, C.E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniasis. Part II: topically applied insecticide treatments and

prophylactic medications. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 117, p. 19–27, 2014.

APÊNDICE A- Ficha de avaliação clínica dos cães

FICHA CLÍNICA

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome do animal:	I.D.:
Local de origem:	Destino: () Adoção () Eutanásia () Domiciliado
Responsável:	
Endereço:	Tel. ()
Material colhido: () Punção de medula ___µl () Sangue ___ml () Aspirado de lesão ___µl () <i>Imprint</i> de lesão () raspado de lesão	Data da coleta: ___/___/___ Data do processamento: ___/___/___

- Indicação de inclusão no experimento: _____

2 DADOS DO ANIMAL

RAÇA: _____ IDADE: _____ SEXO: M () F ()
 PORTE: () PEQUENO () MÉDIO () GRANDE
 COR: () CLARA () ESCURA
 PELAGEM: () CURTA () LONGA

3 EXAME FÍSICO GERAL

a) Inspeção

Lesão de pele: () sim () não (MARCAR NA RESENHA)
 Onicogrífose: () sim () não
 Escore corporal do cão: () Caquético () Magro () Normal () Gordo () Obeso.
 Abdômen: () Normal () Dilatado () Abaulado () Retraído () normal
 Desidratação: () 5% () 10% () 15% () 20% () normal
 Edema: () ocular () membros () subcutâneo () normal
 Secreção: () ocular () vaginal/prepucial
 Presença de ectoparasitas: () sim () não
 Dermatite: () sim () não / () localizada () generalizada/ () COM prurido () SEM prurido
 Alopecia: () sim () não
 OUTRAS
 OBSERVAÇÕES: _____

b) Parâmetros vitais

Frequência cardíaca: () aumentada () normal(60/160bpm) () baixa Valor: _____
 Frequência respiratória: () aumentada () normal(18/36mrpm) () baixa Valor: _____
 Tempo de perfusão capilar: () aumentada () normal(1-2 segundos) () baixa Valor: _____
 Temperatura retal: () aumentada () normal(37,5 -39,2°C) () baixa
 Alterações cardiorrespiratórias: () presente () ausente
 Descrição da alteração:

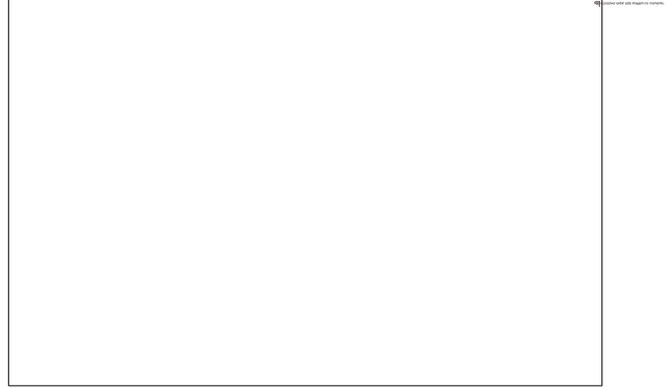
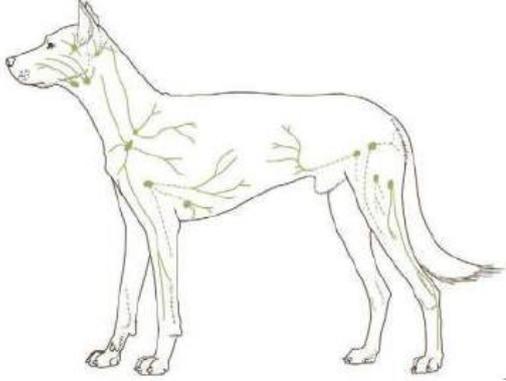
c) Exame de mucosa:

Cor de mucosa ocular: () pálida (esbranquiçada) () congesta ou hiperemica (vermelha) () Cianótica (azul) () ictérica (amarelada)
 () normal
 Cor de mucosa oral: () pálida () congesta ou hiperemica () Cianótica (azul) () ictérica () normal

d) Palpação de linfonodo

Hipertrofia de linfonodos: () sim () não (MARCAR NA RESENHA)
 Mandibular ou Maxilar: () Hipertrofiado () normal
 Pré-escapulares ou cervicais superficiais: () Hipertrofiado () normal
 Poplíteo: () Hipertrofiado () normal
 Inguinais: () Infartado () normal

- e) **Palpação de abdominal**
- Fígado:** () aumentado () normal
- Baço:** () aumentado () normal
- intestino:** () aumentado () normal
- Presença de fezes:** () sim () não
- Gestante:** () sim () não



Lado esquerdo

Lado direito

f) **Classificação:**

Sintomático ()

Assintomático ()

Controle ()

APÊNDICE B – TCLE**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Projeto: Avaliação da resposta imune celular em cães (*ex vivo*) frente a novos antígenos (quimeras) de *Leishmania* spp.

Eu, _____, RG _____, proprietário do animal _____, espécie _____ aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar uma nova possibilidade para o desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses. Fui informado que meu animal será submetido à coleta de sangue para os testes de diagnóstico da leishmaniose visceral / leishmaniose tegumentar Americana e doença de Chagas, em caso de sintomas da leishmaniose visceral, também será coletado punção aspirativa de linfonodo e medula óssea, sem que haja nenhum dano à saúde do mesmo. Fui informado ainda que o meu animal será anestesiado para não sentir nenhuma dor ou desconforto durante a coleta; que quem vai fazer o procedimento é a médica veterinária responsável pelo projeto. Durante a assinatura deste termo fui esclarecido acerca dos benefícios desse estudo, que contribuirá para desenvolver uma nova medida de controle da doença e que os materiais coletados serão incorporados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Patógenos do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão por tal. Estou ciente que não haverá nenhum incentivo financeiro para participação nesta pesquisa.

Contatos: **Dr^a. Milena de Paiva Cavalcanti, IAM/FIOCRUZ – Tel. (81) 2101-2660**

Assinatura Participante

Assinatura Coordenadora

Recife, ____/____/____

ANEXO A - Certificado da licença na CEUA



Mir istório da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

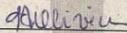
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Avaliação da resposta imune celular em cães (ex vivo) frente a novos antígenos (quimeras) de *Leishmania* spp.**, protocolado sob nº 76/2014 pelo (a) pesquisador (a) Milena de Paiva Cavalcanti. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 25/05/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até junho de 2017.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
<i>Canis lupus familiares</i> (cães)	Amostragem de conveniência

We certify that project entitled **Avaliação da resposta imune celular em cães (ex vivo) frente a novos antígenos (quimeras) de *Leishmania* spp.** Protocol nº 76/2014, coordinated by Milena de Paiva Cavalcanti. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on May, 25, 2015. In present version this project is licensed and valid until June, 2017.

Recife (PE, Brazil) May, 25, 2015.


Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

ANEXO B - Termo Aditivo ao Certificado de licença na CEUA


 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

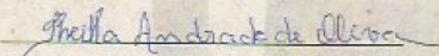
Comissão de Ética no Uso de Animais

Recife, 23 de março de 2017

Termo Aditivo ao Certificado de Licença Nº 76/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CEUA/CPqAM, em atenção à solicitação do(a) pesquisador (a): **Milena Paiva Cavalcanti**, autoriza o presente Aditivo que altera a vigência desta licença, referente ao Projeto intitulado: **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES (EX VIVO) FRENTE A NOVOS ANTÍGENOS (QUIMERAS) DE *Leishmania* spp.**

Ressaltamos que a nova data de validade desta licença é 31 de julho de 2019.


 Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais – CEUA
 Mat. SIAPE 1554975
 e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br