

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ALINNE RANGEL DOS SANTOS RENZETTI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA
PELA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE (NH36) DE
Leishmania (L.) donovani EM CÃES IMUNIZADOS
COM A VACINA Leishmune®**

Rio de Janeiro

2017

DISSERTAÇÃO DPCDI - INI/Fiocruz A. R. S. RENZETTI 2017

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA
NUCLEOSÍDEO HIDROLASE (NH36) DE *Leishmania*
(*L.*) *donovani* EM CÃES IMUNIZADOS COM A VACINA
Leishmune®

ALINNE RANGEL DOS SANTOS RENZETTI

Dissertação apresentada ao curso de
pós-graduação em Pesquisa Clínica
em Doenças Infecciosas do Instituto
Nacional de Infectologia Evandro
Chagas para obtenção do grau de
Mestre em Ciências

Orientadores: Prof. Dr. Fabiano
Borges Figueiredo e Prof. Dra. Paula
Mello De Luca

Rio de Janeiro

2017

Dedico este trabalho aos meus pais
Jorge (*in memorian*) e Aparecida, por
todo amor e dedicação.

A minha vó Aidine e minha irmã
Alessandra, por todo apoio.

A minha família e amigos, pela
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha existência e salvação, por tudo o que tens proporcionado em minha vida, pois sem Ti nada sou e nada posso. Obrigada meu Senhor! Quantas vezes eu pensei em desistir, com inúmeros choros e angústia, mas Deus Pai, sempre renovou minhas forças para prosseguir e trilhar meu caminho. Sinceramente, não tenho palavras para descrever a minha imensa gratidão. Eu te amo, meu Deus!

Ao meu querido pai Jorge (*in memoriam*), por todas as nossas conversas, conselhos, orientações e discussões das mais diversas, desde política até história. Obrigada, pelos finais de semana prazerosos. Apesar do pouco tempo que a vida nos concedeu, aprendi muito com o senhor. Nunca te esquecerei.

Em especial a minha vó Aidine, minha mãe Aparecida e irmã Alessandra, por serem essas mulheres guerreiras e maravilhosas, no qual ensinam-me a cada dia ser uma pessoa melhor. Obrigada pelos incentivos e ajuda!

A minha família, minhas tias e primos, em especial a minha madrinha, tia Mônica, que sempre me aconselhou em momentos que pensei que não teria solução, por seu apoio e carinho de sempre, e ao Pedro, uma criança adorável e tão inteligente, que através do seu sorriso contagiante transformava os meus dias cansativos em pura diversão.

Ao meu querido amigo/irmão William Perillo (Will), que desde os tempos da escola demonstrou ser uma pessoa confiável e bondoso, sempre pronto para ouvir minhas opiniões sobre tudo. Obrigada Will pela sua amizade!

Aos meus queridos amigos e afilhados Monique e Alex, e ao meu amigo Edson, por todas as conversas, pela paciência e compreensão, e principalmente, por proporcionarem momentos inesquecíveis nas trilhas com muitas risadas. Vocês são muito especiais na minha vida!

A minha amiga Thayanne, por me fazer dormir altas horas da madrugada conversando com altas risadas. Ao Gleyner, pela amizade e pelas nossas conversas edificantes.

Aos meus amigos Nathalia, Matheus e João Paulo, por todos os momentos que passamos juntos e pelas discussões de ideias. Vocês são demais!

Ao Eduardo (Dudu), que “abriu” a minha mente para os meus ideais políticos, a Nathalie e a minha afilhada Beatrice (Bia), que a cada dia me encanta com seu sorriso e doçura. Dinda ama você!

Aos meus queridos amigos Afrânio e Prsicila, apesar da distância, estamos sempre juntos.

Aos meus amigos Cabralinos: Fernanda, Renan, Tiago, Yasmin, Diego, Camila e Douglas, por estarem sempre presente.

Ao Jopac, em que as minhas sextas feiras foram preenchidas com estudos tão primordiais e edificantes que mudaram a minha vida.

As amiguinhas, Aline, Barbara, Eloan e Vanessa por todos esse anos de amizade e companheirismo desde os tempos da Faculdade. A mascote Duda, por deixar meus dias mais gracioso quando recebo as suas fotos.

As minhas professoras da Faculdade Pra. Dra. Viveca Giongo, Pra. Dra. Patrícia Camera e Pra. Dra. Ana Cristina Rivas por todo conhecimento adquirido e por me fazerem amar o ensino científico.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia- LIP: Michelle, Vanessa e Lana que me acompanharam desde a iniciação científica, ao Juan e Rodrigo, que me ajudaram quando tive algumas dúvidas, ao Alessandro, que sempre tirou as minhas dúvidas na citometria desde iniciação

científica, a Clarissa, que no momento mais crítico me estendeu a mão, sempre me ajudando quando tinha inúmeros experimentos ao mesmo tempo, e em especial a Virgínia, minha companheira nas viagens de trem compartilhando momentos de desabafos e com muitos chocolates. A Jéssica e Rossina, por todo apoio e carinho.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia-LIP, que abriu as portas quando era apenas uma aluna de iniciação científica, a Dra Léa Cysne que sempre esteve disposta a me ensinar e tirar minhas dúvidas a Dra Joseli Oliveira pelo incentivo de sempre.

Ao Laboratório de Dermatozoonoses- Lapidin-Dermzoo por ter me recebido de braços abertos, em especial aos veterinários Artur, Tuane, Adilson e Sara que foram essenciais nas coletas de amostras dos animais. Em especial a minha amiga Monique, que me ajudou desde sempre, antes mesmo do meu ingresso ao Mestrado, realizando os nossos experimentos imensos, solucionando os problemas diversos e principalmente, marcando as reuniões para discutir sobre os nossos trabalhos.

A secretária acadêmica Priscilla de Sá, que me ajudou com a documentação da Faculdade para o ingresso no Mestrado, e todas as declarações que solicitei durante esses dois anos. Obrigada pela sua ajuda desde o primeiro dia!

Ao Laboratório da Dra Clarisa Palatnik no Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelas proteínas e peptídeos cedidos para a realização dos experimentos, em especial a Dra Dirlei Nico e Marcus, por toda paciência, carinho e risadas durante os experimentos.

A Plataforma de Citometria de Fluxo Núcleo Cell-Sorting do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, em especial a Thaize Quiroga pelos almoços e conversas intermináveis.

Ao meu orientador Dr. Fabiano Figueiredo pela sua atenção, dedicação e

cautela nos momentos mais difíceis deste estudo, e principalmente, pelos conselhos valiosos. Nesses dois anos, aprendi muito com o senhor e nunca esquecerei, mas guardarei a sua célebre frase “Tudo vai dar certo!” Muito obrigada, chefe!

A minha orientadora Dra Paula De Luca, minha mãe científica, pela paciência, compreensão e pela nossa amizade em todos esses anos. Obrigada por TODOS os ensinamentos desde citometria até as nossas discussões sobre política. Guardarei seus conselhos e aprendizados comigo para sempre!

“Se não houvesse outra prova, o polegar por si só me convenceria da
existência de Deus”

Isaac Newton

RENZETTI, A. R. S **Avaliação da resposta imune induzida pela Nucleosídeo Hidrolase (NH36) de *Leishmania (L.) donovani* em cães imunizados com a vacina Leishmune®.** Rio de Janeiro, 2017. 88 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum* e tem como seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*. Os cães são o reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico já que, mesmo quando assintomáticos, albergam o parasita na pele, sendo bem descrito o fato que os casos caninos precedem os casos humanos da doença. Apesar dos esforços do Ministério da Saúde na implementação de medidas de controles da LV, a mesma encontra-se em franca expansão no território brasileiro. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para a proteção contra a leishmaniose visceral canina poderá ser uma melhor forma de controle. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi caracterizar *ex vivo* os fenótipos celulares por citometria de fluxo e a produção de anticorpos IgG totais pela técnica de ELISA, em grupos de cães sadios antes da vacinação (T0) e em três momentos pós-vacinação (T1, T2, T3) com a vacina Leishmune®, durante um ano, e em cães naturalmente infectados provenientes de área endêmica de LVC. Nossos resultados demonstraram uma distinção de níveis de anticorpos IgG totais para os antígenos recombinantes em relação aos grupos estudados, destacando-se as frações F2 e F3 no grupo de cães vacinados, com níveis de IgG similares e constantes após um ano de vacinação. Por outro lado, a fração F1 apresentou níveis baixos de IgG no grupo de cães vacinados e no grupo de cães naturalmente infectados. Em relação ao contexto *ex vivo*, observamos uma tendência na diminuição dos percentuais de linfócitos TCD3+CD4+ após a vacinação, contudo, os percentuais de células CD4+CD25+ não apresentaram diferença estatística entre os grupos de cães sadios e vacinados. O fenótipo celular TCD3+CD8+ demonstrou um aumento significativo no grupo de cães naturalmente infectados sintomáticos, enquanto observamos diferenças estatísticas nos percentuais de células T CD8+CD25+ quando comparados o grupo de cães vacinados e naturalmente infectados. Em contrapartida, o perfil de linfócitos B demonstrou uma tendência a diminuição em seus percentuais no período pós-vacinal, e ainda mais acentuada no grupo de animais infectados, em comparação com o grupo de cães sadios (T0).

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina, Leishmune®, Nucleosídeo Hidrolase.

RENZETTI, A. R. S **Evaluation of the immune response induced by *Leishmania (L.) donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) in dogs immunized with the Leishmune® vaccine.** Rio de Janeiro, 2017. 88 f. Dissertation [Master's in Clinical Research in Infectious Diseases] - National Institute of Infectology Evandro Chagas.

ABSTRACT

In Brazil, Visceral Leishmaniasis (LV) is caused by *Leishmania infantum* and has as its main vector *Lutzomyia longipalpis*. Dogs are the reservoir in the domestic and peridomestic environment since, even when asymptomatic, they harbor the parasite in the skin, and it is well described the fact that canine cases precede the human cases of the disease. Despite the efforts of the Ministry of Health in the implementation of measures of control of LV, it is in full expansion in the Brazilian territory. In this sense, the development of an effective vaccine for protection against canine visceral leishmaniasis may be a better form of control. For this reason, the objective of this study was to characterize *ex vivo* the cell phenotypes by flow cytometry and the production of total IgG antibodies by the ELISA technique in groups of healthy dogs before vaccination (T0) and in three post-vaccination moments (T1, T2, T3) with the Leishmune® vaccine for one year, and in naturally infected dogs from the endemic LVC area. Our results demonstrated a distinction of total IgG antibody levels for the recombinant antigens in relation to the studied groups, with F2 and F3 fractions in the group of vaccinated dogs with similar and constant IgG levels after one year of vaccination. On the other hand, F1 fraction had low levels of IgG in the group of vaccinated dogs and in the group of naturally infected dogs. Regarding the *ex vivo* context, we observed a trend in the decrease of CD3+CD4+T lymphocytes after vaccination, however, the percentages of CD4+CD25+cells did not present statistical difference between groups of healthy and vaccinated dogs. The TCD3+CD8+ cell phenotype demonstrated a significant increase in the naturally infected group of symptomatic dogs, while we observed statistical differences in CD8+CD25+T cell rates when compared to the group of vaccinated and naturally infected dogs. In contrast, the B lymphocyte profile showed a tendency to decrease in its percentages in the post-vaccination period, and even more marked in the group of infected animals, compared to the group of healthy dogs (T0).

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Leishmune®, Nucleoside hydrolase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Promastigota - Forma evolutiva alongada e flagelar de *Leishmania* sp., em meio de cultura 6

Figura 2: Amastigota - Forma evolutiva ovoide e intracelular de *Leishmania* sp., corado por Giemsa 6

Figura 3: Flebotomíneo - Inseto Vetor da Leishmaniose no momento do repasto sanguíneo 8

Figura 4: Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina – LVC 9

Figura 5: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B (CD21+), linfócitos T CD3+CD4+ e T CD3+CD8+ assim como as subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+CD25+ e CD3+CD8+CD25+ no sangue periférico de cães sadios, imunizados nos 3 tempos de estudo ou naturalmente infectados 37

Figura 6: Níveis de anticorpos IgG totais específicos para a proteína NH36, suas frações F1, F2 e F3, e suas quimeras F1|F2 e F1|F3, nos grupos de cães sadios não vacinados (T0, n=10), após 30 dias (T1, n=10), seis meses (T2, n=10) e um ano (T3, n=10) do

Figura 7: Avaliação *ex vivo* dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães saudáveis não vacinados (T0, n=6), após 30 dias (T1, n=6), seis meses (T2, n=6) e um ano (T3, n=6) de aplicação do esquema vacinal 44

LISTA DE TABELA

- Tabela 1** - Acompanhamento dos cães nos grupos T0, T1, T2 e T3 28
- Tabela 2** - Anticorpos monoclonais utilizados para análises de perfil celular 35
- Tabela 3** - Diagnóstico para o critério de inclusão dos cães sadios, grupo T0. Exames de acompanhamento para os mesmos cães nos tempos: T1, T2 e T 39
- Tabela 4** - Cães naturalmente infectados provenientes de Barra Mansa- RJ e que posteriormente foram submetidos à eutanásia 40

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a - aminoácidos

APC - Células Apresentadoras de Antígeno

BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

CD - *Cluster of Differentiation*

CMSP - Células Mononuclear de Sangue Periférico

ConA - Concavalina A

CO₂ - Dióxido de Carbono

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP - *Dual Path Platform*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

FlowJo - *Flow Cytometry Analyses Software*

FML - Ligante Fucose Manose

FSC - *Foward Scatter*

F1 - C-terminal

F2 - porção central

F3 - N-terminal

g - gravidade

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico

IFN-γ - Interferon-γ

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

INOS - Óxido nítrico sintase induzida

KDa - QuiloDalton

KDNA - Ácido desoxirribonucleico – cinetoplasto

kg - Quilogramas

LBSap - *Leishmania braziliensis* Saponina

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

L. amazonensis - *Leishmania Leishmania amazonensis*

L. chagasi - *Leishmania Leishmania chagasi*

L. donovani - *Leishmania Leishmania donovani*

L. infantum - *Leishmania Leishmania infantum*

L. braziliensis - *Leishmania Viannia braziliensis*

L. major - *Leishmania tropica major*

L. mexicana - *Leishmania tropica mexicana*

L. tropica - *Leishmania tropica*

LM - Leishmaniose Mucosa

LPG - Lipofosfoglicano

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LT - Leishmaniose Tegumentar

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LV - Leishmaniose Visceral

mg - Miligrama

M - Molar

mM - Milimolar

mm - Milímetro

mL - Mililitro

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

μm - Micrômetro

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NH36 - Nucleosídeo Hidrolase 36

NK - Natural Killer

nM - Nanomolar

NNN - Meio de cultura bifásico Neal, Novy & Nicolle

NO - Óxido nítrico

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão Fosfato Salínico

pH - Potencial Hidrogeniônico

PKC - Proteína Kinase C

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase *Real Time quantitative*

ROS - Derivados reativos de oxigênio

rpm - Rotação por minuto

RPMI - *Royal Park Memorial Institute Culture Medium*

SFB - Soro Fetal Bovino

SMF - Sistema Mononuclear Fagocítico

SSC - *Side-Scatter*

T - Tempo

TGF- β - Fator de Transformação de Crescimento- β

Th - Células T “helper”

TLRs - Receptores tipo *Toll*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

VL - *Visceral Leishmaniasis*

$^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius

U/mL - Unidade/mililitro

% - porcentagem

LISTA DE SIGLAS

BioManguinhos - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

BMH - *Brazilian Ministry of Health*

BPE - Batalhão de Polícia do Exército

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro
Noel Nutels

LAPCLIN-DERMZOO - Laboratório de Pesquisa Clínica em
Dermatozoonoses em Animais Domésticos

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS - Ministério da Saúde

RJ - Rio de Janeiro

RN - Rio Grande do Norte

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

USA - *United State of America*

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE	4
2.2 IMUNOLOGIA	10
2.2.1 Resposta Imunológica nas Leishmanioses	13
2.2.2 Resposta Imune na LVC	15
2.3 VACINAS	18
2.4 NUCLEOSÍDEO HIDROLASE 36 - NH36	21
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. MATERIAL E MÉTODO	27
5.1 DESENHO DO ESTUDO	27
5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	28
5.2.1 Coleta de sangue periférico e soro	29
5.2.2 Coleta de medula óssea	29
5.3 TESTES PARA DIAGNÓSTICO	30

5.3.1	Cultura parasitológica	30
5.3.2	DPP- DUAL PATH PLATAFORM® – DPP® Leishmaniose Visceral Canina	30
5.3.3	PCR em tempo real qPCR	31
5.3.4	Ensaio imunoenzimático – ELISA	32
5.4	OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES	32
5.5	SOROLOGIA PARA IgG TOTAL	33
5.6	ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR EM <i>EX VIVO</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	33
5.6.1	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	33
5.6.2	Descongelamento de células	34
5.6.3	Marcação de superfície para análise fenotípica <i>ex vivo</i> por citometria de fluxo	35
5.7	ASPECTOS ÉTICOS	38
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
6.	RESULTADOS	39
6.1	TESTES PARA DIAGNÓSTICO	39
6.2	DETECÇÃO DE IgG TOTAL ESPECÍFICA PARA PROTEÍNA NH36 E FRAÇÕES	40
6.3	FENOTIPAGEM CELULAR <i>EX VIVO</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
7.	DISCUSSÃO	45
8.	CONCLUSÕES	49

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública, com uma ampla distribuição geográfica. São um grupo de doenças que ocorrem em 88 países nos cinco continentes, estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirirem uma das formas da doença. A Leishmaniose Tegumentar (LT) como a Leishmaniose Visceral (LV), são consideradas doenças de caráter zoonótico, isto é, quando homens, animais domésticos e silvestres participam na transmissão da doença, disseminando o parasito (DESJEUX, 2001).

A primeira observação de *Leishmania* foi realizada por Cunningham em 1885 em amostra de um paciente indiano com lesão cutânea. Borovsky em 1898 descreveu minuciosamente o parasito de um paciente com a forma cutânea da doença na Rússia. Donovan & Leishman, com trabalhos independentes e desconhecendo o trabalho de Borovsky, redescreveram o parasito em 1903, em um caso de calazar de um paciente indiano. No mesmo ano, Ross denominou este parasito *Leishmania donovani* (REY, 2008).

A Leishmaniose é uma doença que possui manifestações clínicas diversas, dividindo-se basicamente em LT e LV. A LT é causada por parasitas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que conduz ao desenvolvimento de lesões cutâneas (únicas ou múltiplas) e lesões mucosas (acometendo a cartilagem da nasofaringe e superfícies mucosas), possui um espectro de formas clínicas tais como a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD) (PEARSON, 1993; MARZOCHI *et al.*, 1999; BASANO & CAMARGO, 2004). A LV, conhecida como calazar (Kalazar) ou Dum Dum, é causada por espécies do complexo de *Leishmania donovani*, subgênero *Leishmania*, que possuem um tropismo para órgãos internos ricos em macrófagos, afetando principalmente o fígado, baço, medula óssea e nódulos linfáticos (DUARTE, 2000; SAHA *et al.*, 2006).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada por espécies de *Leishmania*

infantum no Velho Mundo e *Leishmania chagasi* no Novo Mundo. No entanto, há evidências de que a *Leishmania (Leishmania) chagasi* possa ser *Leishmania (Leishmania) infantum* trazida do Velho Mundo para o Novo Mundo por imigrantes dos países Mediterrâneos. Esta doença é caracterizada por diversas manifestações clínicas que variam de uma forma assintomática, oligossintomática a sintomática, que levariam o cão infectado à morte (BRASIL, 2006).

Os cães domésticos são responsáveis em propagar a doença a partir de focos enzoóticos, e além disso, existem animais assintomáticos que albergam o parasito na derme, tornando essa doença de grande importância epidemiológica (MARZOCHI, 1985)

Dentre as medidas de controle da LV empregadas pelo Ministério da Saúde (MS) estão o diagnóstico sorológico, apreensão e eutanásia dos cães infectados. Essa prática tem se mostrado uma experiência traumática e de grande desconforto social. Esse desconforto cresce a cada dia já que a medida aparentemente não está contribuindo de forma efetiva para diminuir o número de casos humanos e caninos de LV no Brasil (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

O tratamento dos cães não é preconizado como medida de controle pelo MS já que, até o momento, a cura parasitológica dos animais infectados não foi comprovada em nenhum dos protocolos terapêuticos testados para a LVC. Desta maneira, a imunoprofilaxia é considerada, por muitos autores, como a principal estratégia para o controle e erradicação da LV, já que, a vacinação canina reduziria a incidência em cães e, por consequência, a humana, evitando o sacrifício de cães (CHAPPUIS *et al.*, 2007; PALATNICK-DE-SOUZA, 2008).

Com este objetivo, um grupo de pesquisadores do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ desenvolveram uma vacina denominada Leishmune®, licenciada em 2003 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, (MAPA). Apesar de sua segurança e da ampla utilização da vacina pela classe veterinária, o MAPA, através da nota de esclarecimento em 2014, pronunciou-se sobre a suspensão da licença de comercialização dessa vacina, indicando a existência de estudos pré-clínicos de fase clínica I e II, porém a inexistência e a necessidade de realização de um estudo de fase III (eficácia).

A vacina Leishmune® contém o ligante fucose manose (FML), de *Leishmania*

(*Leishmania*) *donovani*, capaz de inibir fortemente a ligação de promastigotas aos macrófagos. O complexo glicoprotéico Nucleosídeo Hidrolase 36 (NH36-) é o principal complexo antigênico do FML. A NH36 foi sequenciada e peptídeos sintéticos que perfazem toda a sua sequência foram desenvolvidos pelo grupo da UFRJ e testados em modelo experimental murino com resultados promissores (NICO *et al.*, 2010).

Por este motivo, visto que estaremos estudando antígenos que são apontados como imunógenos potentes presentes nesta preparação vacinal, é extremamente interessante não só avaliar a resposta a esses candidatos após estimulação de células obtidas de animais infectados e não infectados, como também de animais previamente imunizados com a Leishmune®, o que aumenta grandemente a possibilidade de que uma resposta robusta contra esses antígenos seja gerada e conseqüentemente melhor avaliada. Vale ressaltar que nosso trabalho é o primeiro a avaliar as respostas induzidas por essas proteínas em células de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

Estima-se que aproximadamente 350 a 400 milhões de indivíduos no mundo estejam sob o risco de adquirir a leishmaniose e que 12 a 14 milhões estejam infectados. Além disso, sabe-se que 59.000 indivíduos morrem anualmente de LV, dentre os quais 35.000 são homens e 24.000 são mulheres. É importante destacar que esses números são apenas estimativas e estes dados podem estar subestimados, devido às dificuldades encontradas nos sistemas de notificação dos países onde decorre esta doença (DESJEUX, 2004; WHO, 2010).

A leishmaniose humana possui uma incidência de 1,6 milhões de casos por ano, sendo que meio milhão são de LV e 1,1 milhão de LT. Na LV, apenas 500 mil casos são notificados por ano sendo que, em 2015, 88,8% dos casos globais de LV foram relatados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com maior número de casos reportados em 2015 são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos também representam 90% da incidência global de LC relatada (ASHFORD *et al.*, 1992; WHO, 2016). O Brasil é o responsável pelo maior número de casos registrados nas Américas, assumindo cerca de 90% do total de casos de Leishmanioses nesse continente (MONTEIRO *et al.*, 1994).

Assim, como no território brasileiro a LV é considerada uma doença negligenciada e endêmica, e que atualmente, encontra-se em expansão nas regiões urbanas e rurais nos países da América Latina, Europa e Ásia. Em alguns países da

América do Sul, a principal forma clínica manifestada era a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e a LV era considerada uma doença inerente. Entretanto, na Argentina os casos de LV humana surgiram a partir de 2005, e os números de casos cresceram gradativamente juntamente com o número de óbitos causados pela doença (SALOMÓN & ORELLANO, 2005; SALOMÓN *et al.*, 2009).

A LV era considerada uma doença que acometia moradores e trabalhadores de áreas rurais, no entanto, hoje são encontrados focos em centros urbanos, possivelmente devido à migração de pessoas e seus animais infectados das regiões precárias, sem nenhum saneamento e informações sobre a doença (ABRANCHES *et al.*, 1991; WERNECK, 2014). Este processo de urbanização ocorreu gradativamente nos últimos trinta anos, nos quais as primeiras epidemias urbanas foram encontradas em Teresina no estado do Piauí (COSTA *et al.*, 1990) e São Luiz no estado do Maranhão (SILVA *et al.*, 1997). Logo após, foram descritos surtos da doença na cidade do Rio de Janeiro (MARZOCHI *et al.*, 1994), em Belo Horizonte no estado de Minas Gerais (LUZ *et al.*, 2001), em Três Lagoas e Campo Grande no estado do Mato Grosso (MESTRE *et al.*, 2007) e Palmas no estado de Tocantins (BRASIL, 2006).

Em 1977, foi relatado o primeiro caso de LV humana associado à presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* e infecção canina, na zona oeste na cidade do Rio de Janeiro e, posteriormente, os casos caninos foram descritos com frequência nos ambientes peri-urbanos desta região (MARZOCHI *et al.*, 1985; MARZOCHI *et al.*, 1985). Entre os anos de 2010 e 2014, ocorreram casos de LVC em áreas urbana e rural, observando-se uma expansão desta doença no estado do Rio de Janeiro. No ano de 2010, foi registrado o primeiro caso autóctone no bairro de Laranjeiras localizado na zona sul da cidade do Rio de Janeiro (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Entre os anos de 2011 e 2013, foram descritos casos de LVC nos municípios de Mangaratiba, Maricá, Volta Redonda e na cidade do Rio de Janeiro (DE PAULA *et al.*, 2009; RIO DE JANEIRO, 2012; CAMPOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015), e em 2013, foi relatado o primeiro caso alóctone de LVC em Resende. O primeiro foco urbano de transmissão ativa de LVC foi registrado com 25 casos no bairro do Caju, localizado na zona portuária do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

Os agentes etiológicos da leishmaniose são os protozoários flagelados que pertencem ao filo Euglenozoa, sub-filo Sarcostoma, classe Kinetoplastida, ordem

Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, (ROBERTS & JANOVY, 2009) gênero *Leishmania*, Ross em 1903. Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem em seu citoplasma uma organela denominada de cinetoplasto, característico da ordem Kinetoplastida. Esta organela é composta por uma rede de moléculas de DNA circulares-kDNA, que se dividem em maxicírculos e minicírculos (SIMPSON, 1987). Os parasitos possuem dois estágios evolutivos: a promastigota que é caracterizada por sua forma alongada, medindo 8-15 μm , contendo um flagelo emergindo anteriormente que permite a sua locomoção, encontrada no trato intestinal do hospedeiro invertebrado (**Figura 1**), e amastigota que é caracterizada por sua forma ovoide (elíptica), medindo 3-5 μm , e possui um flagelo interiorizado dentro da bolsa flagelar que realiza endocitose e exocitose. A forma amastigota é uma forma evolutiva intracelular que infecta células mononucleares do hospedeiro vertebrado (**Figura 2**) (REY, 2008; BRASIL, 2010).



Figura 1: Promastigota - Forma evolutiva alongada e flagelar de *Leishmania* sp., em meio de cultura (Fonte: Brasil, MS 2010)

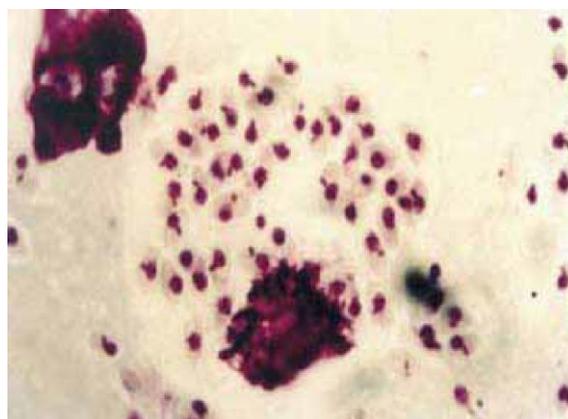


Figura 2: Amastigota - Forma evolutiva ovoide e intracelular de *Leishmania* sp., corado por Giemsa (Fonte: Brasil, MS 2010)

Os subgêneros de *Leishmania* são classificados taxonomicamente de acordo com a localização do parasito no aparelho digestivo dos flebotomíneos. Os parasitos que se aderem à porção anterior e média do intestino, comportamento suprapilário, são agrupados no subgênero *Leishmania*, e os que apresentam uma fase de divisão em que se aderem à parede do intestino posterior, desenvolvimento peripilário, pertencem ao subgênero *Viannia* (LAINSON *et al.*, 1979). O gênero *Leishmania* possui muitas espécies e a classificação taxonômica baseia-se nas características do parasito nos animais de laboratório, nos vetores e no aspecto clínico e epidemiológico da doença que acomete o homem. O sistema de classificação é acrescentado com uma variedade de métodos bioquímicos e imunológicos, incluindo o mapeamento de DNA e a reatividade imunológica a anticorpos monoclonais (DUARTE, 2009).

A LV é causada pelas espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani*, encontrada no Velho Mundo, e a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, considerada similar a *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO *et al.*, 2001), e que se encontra no Novo Mundo (MELO, 2004; KAYE & AEBISCHER, 2011).

Atualmente, são reconhecidas onze espécies de *Leishmania* causadoras da LTA (COSTA, 2005). No Brasil, foram identificadas sete espécies, sendo seis espécies do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies circulantes no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2010).

Os insetos vetores, os flebotomíneos, são pequenos, medindo 2 a 3 mm e possuem um corpo com intensa pilosidade (**Figura 3**). Estes insetos são holometábolos, contendo um ciclo de vida através de fase de ovo, fase larval, fase de pupa e o adulto (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Phlebotomus*, responsável pela transmissão no Velho Mundo descrito por Rondani & Berté, em 1840 e gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo, por França em 1924 (REY, 2008).



Figura 3: Flebotomíneo - Inseto Vetor da Leishmaniose no momento do repasto sanguíneo (Fonte: Brasil, MS 2010)

Conforme mencionado anteriormente, o parasito possui dois estágios principais durante o ciclo de vida: promastigotas, formas flageladas e extracelulares, e amastigotas, formas intracelulares obrigatórias e com flagelos inaparente por microscopia óptica, encontradas em monócitos e macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos injetam as formas promastigotas do parasito e a sua saliva na pele do hospedeiro vertebrado. As células do Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) do hospedeiro, principalmente os macrófagos, endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e se multiplicam no interior do fagolisossomo por divisão binária longitudinal. Quando a célula hospedeira original se rompe, os parasitos infectam novas células. (SECUNDINO *et al.*, 2005).

O flebotomíneo, ao se alimentar de um hospedeiro infectado, ingere os macrófagos contendo as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas, por divisão binária, ocorrendo mudanças morfológicas e fisiológicas. O primeiro estágio no vetor invertebrado é chamado promastigota procíclica, possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica. Posteriormente, essas parasitas se diferenciam em nectomonas, que são caracterizadas por suas formas alongadas e com alta motilidade, e que se diferenciam em leptomonas, que são caracterizados por suas formas curtas (CHOI & LERNER, 2001). Por seguinte, algumas dessas leptomonas diferenciam-se em haptomonas e outras em promastigotas metacíclicas, que apresentam alta motilidade, possuindo forma longa e flagelo alongado, não sendo mais capazes de sofrer divisão binária. As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo pelo inseto flebotomíneo (BATES, 2007) (**Figura 4**).

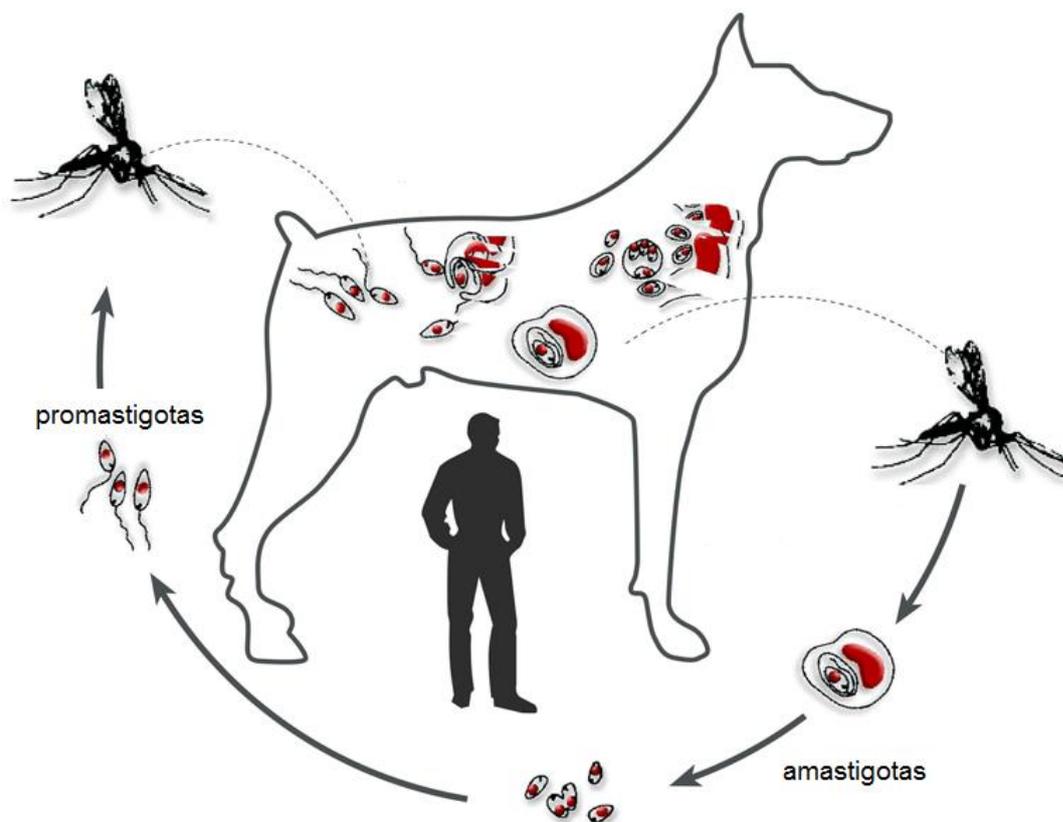


Figura 4: Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina – LVC
(Fonte: <http://www.ambulatorioandromeda.it/leishmaniosi.php>.) Acessado em 2015

Na LVC, as manifestações clínicas causadas pela infecção por *L. infantum* possuem um espectro diverso, variando desde uma infecção assintomática ou oligossintomática a uma intensa sintomatologia (animais sintomáticos) (JERÔNIMO *et al.*, 2000; MANCIANTI *et al.*, 1988). Essas manifestações clínicas dependem da interação do sistema imune do animal com o parasito, que penetra nas células imunológicas do hospedeiro vertebrado, diminuindo a atividade microbicida dessas células, proporcionando a modulação da resposta imunológica (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Alguns fatores podem definir a gravidade das manifestações como: as condições ambientais (MORENO *et al.*, 2005), faixa etária (CALDAS *et al.*, 2002), estado nutricional (BERN *et al.*, 2007) e a resposta imunológica do hospedeiro (GAMA *et al.*, 2004).

A evolução da doença pode ser manifestada em forma aguda e grave, levando o animal à morte, ou o animal pode manifestar a doença de um modo lento, onde a doença persiste por anos, apresentando ou não sinais clínicos, podendo evoluir para

uma regressão (MARZOCHI *et al.*, 1985). Na forma assintomática, os cães não possuem sinais clínicos aparentes, sendo diagnosticado através da sorologia (BERMAN, 1997). Os sinais clínicos mais frequentes na LVC são alopecia, dermatites, onicogribose, úlceras cutâneas e hepatoesplenomegalia (ALVAR *et al.*, 2004), e ainda incluem perda de peso, linfadenopatia, lesões oculares, diarreia crônica, epistaxe, problemas de locomoção e atrofia muscular. Sinais como hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e anemia também são observados (GIUNCHETTI *et al.*, 2006, 2008; REIS *et al.*, 2006, 2010).

2.2 IMUNOLOGIA

O sistema imune desencadeia mecanismos de reconhecimento para defesa contra microrganismos intracelulares e extracelulares e até mesmo células produzidas pelo próprio organismo. A resposta imunológica se divide basicamente entre a resposta imune inata, a linha inicial de defesa, e a resposta imune adquirida, caracterizada pela especificidade de distinguir as moléculas (ABBAS *et al.*, 2008).

Dentre os componentes da imunidade inata, destacam-se as células fagocíticas como os macrófagos e os neutrófilos, que são capazes de ingerir e destruir os patógenos, as células dendríticas, as células *Natural Killer* (NK), que possuem atividade citotóxica, além do sistema complemento e as citocinas que regulam a atividade das células da resposta inata (AKIRA & TAKEDA, 2004).

As células da imunidade inata são ativadas através das substâncias dos microrganismos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrão (PPRs), presentes na superfície celular, em vesículas endossômicas e no citoplasma (JANEWAY & MEZHITOV, 2002).

Como já foi descrito, os macrófagos, neutrófilos e as células dendríticas participam da imunidade inata. Estas células reconhecem os microrganismos através

dos PAMPs, e, através da fagocitose, processo de englobamento dos patógenos, os destroem. Os neutrófilos são as células mais abundantes dentre outras células que participam da imunidade inata, e possuem alto potencial de migração e atividade microbicida. Desta forma, são os principais agentes circulantes que em poucas horas após a entrada do microrganismo, podem migrar para o local da infecção (JANEWAY & MEZHITOV, 2002).

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que através do processo de fagocitose são capazes de destruir os microrganismos, sendo essa a sua principal função. Além da destruição do parasita, os macrófagos possuem papel fundamental também no desenvolvimento da imunidade adquirida, pois apresentam os antígenos dos microrganismos aos linfócitos T. São capazes de reconhecer os microrganismos rapidamente, e persistem por mais tempo no local da infecção. Diferentemente dos neutrófilos, os macrófagos podem sofrer divisão celular no local da inflamação (FLAJNIK & DU PASQUIER, 2004).

As células fagocíticas, macrófagos e neutrófilos, quando ativados transformam o oxigênio molecular em derivados reativos de oxigênio (ROS), que são altamente reativos e tóxicos para muitos microrganismos e outras células. A fagócito oxidase é uma enzima que está presente nos fagócitos ativados, sobretudo na membrana fagolisossômica. Sua indução e ativação dependem de muitos estímulos, envolvendo citocinas como o interferon-gama (IFN- γ) e sinais dos receptores tipo *Toll* (TLRs). Esta enzima reduz o oxigênio molecular em ROS (AKIRA & TAKEDA, 2004).

Os macrófagos, por sua vez, também são capazes de produzir intermediários reativos de nitrogênio, especialmente o óxido nítrico (NO), através da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma enzima citosólica, que não está ativa nos macrófagos em repouso. Esta enzima catalisa a transformação da arginina em citrulina, resultando na liberação do NO. O NO no interior dos fagolisossomos, pode se ligar ao peróxido ou superóxido de hidrogênio, que foram gerados pela fagócito oxidase, produzindo radicais de peroxinitrito que podem eliminar os microrganismo (MacMICKING *et al.*, 1997).

As células NK são ativadas por uma regulação entre os sinais que são gerados de receptores de ativação e de inibição. A interação com as células

infectadas resulta na interação dos receptores inibidores e ativadores que são expressos simultaneamente pelas células NK, que também interage com os ligantes da célula infectada. Os sinais ativadores tendem a ser bloqueados por sinais inibitórios, para que evite a ativação e ataque das células NK contra as células não infectadas (BOTTINO *et al.*, 2005). Já as células dendríticas, que são caracterizadas por possuírem longas projeções membranosas, reconhecem os microrganismos através da fagocitose e os transportam para os linfonodos drenantes. Durante este processo, as células dendríticas amadurecem, e passam a se comportar como potentes células apresentadoras de antígeno (APC), estimulando as células T imaturas (GUEMONPREZ *et al.*, 2002).

A imunidade adquirida é fundamentada nas células denominadas linfócitos, que estão presentes no sangue, na linfa, nos órgãos linfoides e em alguns tecidos. Este tipo de resposta é responsável pelo reconhecimento de antígenos, ativação de linfócitos e manutenção de células de memória. Os linfócitos são células que podem reconhecer e distinguir especificamente diferentes antígenos, caracterizando a resposta imune adquirida por sua especificidade e memória. Os linfócitos se classificam em linfócitos T, pois são derivados no Timo, e linfócitos B que se desenvolvem na medula óssea. Os linfócitos B produzem anticorpos, enquanto os linfócitos T medeiam a imunidade celular (ABBAS *et al.*, 2008)

A resposta imune adquirida necessita da imunidade inata para apresentar o antígeno aos linfócitos T imaturos que reconhecem o antígeno (GUEMONPREZ *et al.*, 2002). Esta ativação depende do reconhecimento de peptídeos de antígenos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II na superfície da célula-alvo pelo receptor TCR do linfócito T CD8+ ou T CD4+, respectivamente (YEWDELL & BENNINK, 1999).

A ativação dos linfócitos T CD4+ imaturos necessita de dois sinais: o primeiro sinal envolve o reconhecimento do antígeno apresentado pelas APC (células apresentadoras de antígeno), via MHC acima mencionado e o segundo sinal envolve o reconhecimento de moléculas co-estimulatórias. As células dendríticas reconhecem especificamente o antígeno nos locais da infecção, essas células amadurecem e se tornam APC, responsáveis pelo primeiro sinal para ativação do linfócito (GUEMONPREZ *et al.*, 2002). O segundo sinal é proveniente de moléculas

co-estimulatórias, que sofrem regulação positiva e são expressas na superfície da APC como as glicoproteínas B7-1 e B7-2, que se ligam a molécula CD28 presentes na superfície da célula T. Esta ligação emite sinais para as células T, levando a produção de IL-2, e sobrevivência celular, e a diferenciação de células T imaturas em células efetoras e/ou de memória (CHEN, 2004).

As células T CD4⁺ podem ser subdivididas em diferentes subpopulações, dentre elas Th1 e Th2, caracterizadas pela expressão diferenciada de algumas citocinas e suas funções efetoras distintas. As citocinas participam na expansão das subpopulações, como o IFN- γ que promove a diferenciação da resposta Th1 e inibe a proliferação das células Th2, que por sua vez, produzem a IL-4, envolvida na diferenciação das células Th2 e a IL-10, que inibe a ativação Th1. Desta forma, as subpopulações desencadeiam uma regulação cruzada, pois as respostas Th1 e Th2 conseguem se auto ativar (WYNN, 2004).

2.2.1 Resposta imunológica nas Leishmanioses

A resposta imunológica no hospedeiro vertebrado se inicia após o repasto sanguíneo do inseto vetor, que regurgita de 100 a 1.000 promastigotas na pele do indivíduo. Após a regurgitação, as formas metacíclicas entram em contato com a pele, ligando-se às moléculas do sistema complemento, e posteriormente ativam a via clássica e via alternativa. No entanto, esses parasitas resistem à destruição devido a presença de lipofosfoglicano (LPG) em sua membrana (MOSSER & BRITTINGHAM, 1997).

Os macrófagos e neutrófilos são sinalizados pelas quimiocinas, CCL3 CCL4 e CxCL2, e por moléculas do sistema complemento, a migrarem para o local da invasão. Os macrófagos são ativados por citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), levando a produção de intermediários reativos de oxigênio (IROs) e intermediários reativos de nitrogênio (IRNs) (STENGER *et al.*, 1994). O estudo de Moreira e colaboradores em 2009 demonstraram que os parasitos desenvolveram

mecanismos contra este estresse oxidativo, que são a inibição da Proteína Kinase C (PKC) e a produção de enzimas, como a arginase e tripanotona. A enzima arginase interfere na via de L-arginina, substrato através do qual a enzima óxido nítrico sintase produz NO, levando a diminuição da disponibilidade de L-arginina para produção de NO, e a produção aumentada de poliaminas; que são utilizadas pelo parasita para crescimento e diferenciação (COLOTTI *et al.*, 2011).

No estudo de Peters e colaboradores (2008), foi observado que os neutrófilos migram para o local da picada de flebotomíneos, ou do inóculo experimental, onde são invadidos com eficácia por promastigotas de *L. major* permanecem viáveis no interior dessas células.

Segundo o estudo de Zandbergen e colaboradores (2004), os neutrófilos apoptóticos infectados por parasitos do gênero *Leishmania* são fagocitados por macrófagos, e o parasito consegue sobreviver e multiplicar em seu interior, resultando na liberação do TGF- β , uma potente citocina anti-inflamatória. Este comportamento foi denominado “Cavalo de Tróia”, pois a *Leishmania* interage com as células hospedeiras de uma forma “silenciosa” (STEBUT *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 2009)

As células dendríticas da pele (ou células epidérmicas de *Langerhans*) são parasitadas por uma ou duas amastigotas por célula e a multiplicação parasitária independe da ação do NO (BLANK *et al.*, 1996). Estas células possuem um papel importante na patogênese da Leishmaniose, pois, após a migração para os linfonodos, ligam a resposta imune inata à resposta adaptativa, através da apresentação e a ativação diferencial das subpopulações dos linfócitos TCD4+ Th1, ou resposta pró-inflamatória, e Th2, ou resposta anti-inflamatória (STENGER *et al.*, 1994).

Nas Leishmanioses, a resposta imune celular possui uma grande importância em relação à resistência e suscetibilidade. Foi em um estudo experimental com camundongos isogênicos infectados com *L. major* que se estabeleceu o paradigma entre a subpopulação de linfócitos TCD4+, onde células CD4+ produtoras de IFN- γ , foram denominadas T “helper” 1, resposta Th1, e estavam associadas com a resistência ao parasita, enquanto os linfócitos TCD4+, produtoras de IL-4 e IL-10, denominados T “helper” 2, resposta Th2, estavam associados à suscetibilidade.

(LIEW *et al.*, 1990; SACKS & NOBAN-TRAUTH, 2002).

Camundongos BALB/c infectados com *L. major*, produzem IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas do perfil da resposta Th2, e são susceptíveis a infecção, enquanto camundongos C57BL/6 produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α , citocinas do perfil da resposta Th1, e apresentam cura espontânea das lesões (LOCKSLEY *et al.*, 1988). No entanto, o desenvolvimento no perfil de citocinas, as vias de sinalização e o curso clínico diferem em relação às espécies envolvidas do Novo e Velho Mundo (ROCHA *et al.*, 2007). A infecção experimental por *L. braziliensis* desenvolve uma lesão discreta que se cura em poucas semanas (MAIOLI *et al.*, 2004) no camundongo BALB/c, enquanto que a *L. amazonensis* causa lesões graves, independentemente da cepa de camundongo estudada (ABREU-SILVA *et al.*, 2004). Além disso, na infecção com *L. amazonensis* existe um aumento na produção de IFN- γ juntamente com a multiplicação do parasito (QI *et al.*, 2004).

2.2.2 Resposta imune na LVC

É sabido que o desencadeamento de um perfil de resposta imunológica na LVC pode estar associado às manifestações clínicas da doença (BARBIERI, 2006). Como já foi descrito anteriormente, a proteção inicial contra a infecção por *Leishmania* se dá na atuação das citocinas IFN- γ e TNF- α que ativam os macrófagos, que por sua vez, através da produção de NO agem na destruição das amastigotas; este feito foi observado em macrófagos de cães infectados com *L. infantum* e em cães imunizados com promastigotas mortas de *L. infantum* (VOULDOUKIS *et al.*, 1996).

A estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos, com antígeno específico de *Leishmania* demonstrou que a atividade linfoproliferativa é um marcador de resistência/susceptibilidade para a LVC (ANDRADE *et al.*, 1999). O perfil de resistência em cães assintomáticos está associado com a ativação de células do Tipo 1 (Th1), caracterizado pela produção

de citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α (PINELLI *et al.*, 1994;1999). No entanto, a doença ativa caracteriza-se por uma resposta humoral intensa, na qual as manifestações clínicas estão relacionadas com o parasitismo em diferentes tecidos e órgãos (REIS *et al.*, 2006).

Segundo Barbieri (2006), o papel das citocinas do Tipo 2 (Th2) não está bem estabelecido na LVC. A resposta mista do perfil Th1/Th2 foi relatada em células mononucleares de cães assintomáticos após estímulo com antígeno de *Leishmania*, com a expressão de mRNA de IL-2, IL-10 e IFN- γ . Em cães assintomáticos, existe predominância das citocinas IL-2 e IFN- γ , contudo, a expressão da citocina IL-10 não está associada com a sua sintomatologia (CHAMIZO *et al.*, 2005).

Em um estudo com cães naturalmente infectados, foi observado que um bom prognóstico clínico apresenta-se relacionado a produção de altos níveis de IFN- γ , anticorpos da classe IgG e linfoproliferação antígeno-específica em células mononucleares, enquanto que a severidade da doença está ligada ao aumento da produção de IL-10 (BOGGIATTO *et al.*, 2010), uma citocina de caráter primordial que está envolvida na morbidade da doença humana (NYLÉN & SACKS, 2007)

Foi demonstrado que, em um curto período de tempo, os cães experimentalmente infectados com *L. infantum* apresentam expressão de mRNA das citocinas IL-2 e IFN- γ que tardam a implementação da infecção (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002). Em contrapartida, os cães naturalmente infectados com *L. infantum* expressam altos níveis de IFN- γ , enquanto os níveis de IL-4, IL-8 e IL-10 não apresentam aumento em sua expressão (QUINNELL *et al.*, 2001; SANTOS-GOMES *et al.*, 2002).

Chamizo e colaboradores (2005) avaliaram, de forma semi-quantitativa pela técnica de PCR em tempo real, a expressão de citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10 e IL-18 em cães assintomáticos experimentalmente infectados. Além disso, observaram a produção de citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *L. infantum*, confirmando a existência do perfil misto Th1/Th2.

Ademais, em células de cães experimentalmente infectados estimuladas com antígeno de *Leishmania* (CHAMIZO *et al.*, 2005), assim como em células de cães

assintomáticos estimuladas *in vitro* (CARRILLO *et al.*, 2007), foi observada uma alta produção de IFN- γ , enquanto células de cães polissintomáticos (CARRILLO *et al.*, 2007) e do grupo controle (não infectado) não produziram esta citocina (CHAMIZO *et al.*, 2005).

Em amostras de soro de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentando a doença ativa, foram verificados altos níveis de IL-6, quando comparado com o grupo de cães não infectados. Já os níveis de citocina TNF- α permaneceram similares nos grupos estudados (cães naturalmente infectados e não infectados) (LIMA *et al.*, 2007).

A resposta imune humoral na LVC é baseada na ativação policlonal de linfócitos B e produção de imunoglobulinas (IgGs, IgE, IgM e IgA) (REIS *et al.*, 2006a). Entretanto, até o presente momento não se encontra um acordo na literatura sobre a possível imunoglobulina envolvida com um papel anti-*Leishmania*, proporcionando assim, um perfil de resistência na LVC (DAY, 2007). De acordo com Deplazes e colaboradores (1995), a identificação do IgG total não pode ser considerada como um bom marcador para a LVC, mas sim, as suas subclasses IgG1 e IgG2. O IgG1 pode estar associado ao surgimento dos sinais clínicos da doença (NIETTO *et al.*, 1999), enquanto o IgG2 pode estar relacionada com a forma assintomática (LEANDRO *et al.*, 2001).

Em estudo realizado em cães assintomáticos, foi observada uma predominância da subclasse IgG1 vinculados com uma carga parasitária baixa em diversos tecidos. Foi observado também que cães sintomáticos apresentavam altos níveis de IgG2, IgE, IgM e IgA (REIS *et al.*, 2006a; 2006b), sendo que, as imunoglobulinas IgG2 e IgE podem estar relacionadas com a resposta Th2, indicando um mau prognóstico da doença (REIS *et al.*, 2006a). Em outro estudo com cães naturalmente infectados, foi observado um *up-regulation* de praticamente todas as subclasses de IgG, porém, os níveis de IgG2 foram menores em relação às demais subclasses (QUINNELL *et al.*, 2003).

2.3 VACINAS

A LV tem sido relatada como uma doença emergente e com medidas de controles ineficazes, sua prevenção se baseia em três parâmetros que incluem o controle do vetor, controle dos reservatórios e pesquisas e desenvolvimento de vacinas. A sua prevalência está relacionada à insuficiência de drogas anti-*Leishmania* de alta eficiência, a complexidade e heterogeneidade do parasito, a gravidade das manifestações clínicas da doença, e a sua expansão geográfica. Para uma boa formulação no desenvolvimento de uma vacina contra Leishmaniose é necessário entender os mecanismos imunológicos da LV (JAIN & JAIN, 2013; 2015).

No decorrer das últimas décadas, pesquisadores focaram em estudos para o desenvolvimento das vacinas contra Leishmaniose e outras doenças parasitárias. Essas vacinas podem ser classificadas em vacinas de primeira geração, que são compostas por patógenos mortos ou vivos atenuados, que assemelha-se ao processo natural da infecção do patógeno em questão, mas que possui implicações relacionadas a sua segurança e padronização; as vacinas de segunda geração, compostas por extratos purificados dos parasitos, proteínas recombinantes, bactérias e vírus contendo genes de patógenos, são mais seguras porém possuem menor potencial imunogênico; e as vacinas de DNA, denominadas por alguns como vacinas de terceira geração, compostas por DNA plasmidial contendo o gene da proteína do patógeno e que possuem algumas vantagens como a simplicidade em seu processo e o baixo custo (NAGILL & KAUR, 2011; JAIN & JAIN, 2015).

A primeira estratégia vacinal para combater a Leishmaniose em humanos foi a Leishmanização, que se baseava na inoculação de parasitos vivos, obtidos das lesões de pacientes com a infecção, em indivíduos saudáveis, com o intuito de obter lesões que se curariam naturalmente ao passar do tempo. Passaram-se, então, a inocular material de lesões e, mais tarde, parasitos mantidos em cultura, em regiões do corpo cobertas dos indivíduos não infectados (NADIM *et al.*, 1983). Esta prática

foi descontinuada devido a problemas como: lesões crônicas que não se curavam, aparecimento do HIV, uso de drogas imunossupressoras, dificuldade na padronização do inóculo, persistência parasitária e por razões éticas. No presente, a prática é limitada a uma vacina registrada no Uzbequistão (KAMESIPOUR *et al.*, 2006).

No Brasil, em meados da década de 1940, iniciaram-se estudos sobre vacinas com parasitos mortos. A primeira delas era formulada com promastigotas mortos de 18 cepas de *Leishmania* e demonstrou uma eficácia na proteção de 80% (PESSOA & PESTANA, 1941). Mayrink e colaboradores desenvolveram outra vacina composta de promastigotas mortas, no entanto, foram utilizadas cinco cepas de *Leishmania*, circulantes do Brasil (MAYRINK *et al.*, 1979, 1985). Esta vacina demonstrou em um estudo de fase III cerca de 70% de proteção em indivíduos vacinados e com positividade no teste de Montenegro após a vacinação. Independentemente desses resultados, o desenvolvimento dessa vacina foi interrompido por causa da dificuldade encontrada na padronização da mesma. Depois disso, foi desenvolvida outra vacina, denominada Leishvacin, que era composta de promastigotas mortas de uma cepa de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8). Esta vacina obteve uma segurança comprovada e, além disso, foi capaz de produzir uma resposta semelhante à resposta induzida pela vacina anterior composta por cinco cepas de *Leishmania* (DE LUCA *et al.*, 1999; 2001).

Também foram desenvolvidas vacinas de primeira geração para a LVC, nos quais se destacam a Leishvacin e a LBsap. A primeira vacina contém promastigotas mortas de *L. braziliensis* e possui o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) como adjuvante (MAYRINK *et al.*, 1996), e demonstrou a indução de uma resposta celular e proliferação de linfócitos, obtendo 90% de proteção contra a LVC em cães do canil, entretanto, em estudo de fase III esta vacina não foi capaz de produzir um mecanismo de resposta protetora no grupo controle (MAYRINK *et al.*, 1996).

A LBsap é uma vacina composta também por promastigotas mortas de *L. braziliensis*, porém possui na sua composição o adjuvante saponina. Esta vacina demonstrou ser capaz de induzir elevados níveis de IgG *anti-Leishmania*, uma alta proliferação celular, aumento de linfócitos TCD8+ específicos para *Leishmania* e o aumento na produção de NO *in vitro* (GUINCHETTI *et al.*, 2008; VITORIANO-SOUZA

et al., 2008).

No Brasil, também foram desenvolvidas duas vacinas de segunda geração contra a LVC: a Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil), desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2008), e a Leishmune® (Zoetis, Brasil), desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2005; MIRÓ *et al.*, 2008).

A Leish-Tec® é formulada com proteína A2 e tem a saponina como adjuvante. A proteína A2 está presente na superfície das amastigotas, sendo considerado um fator de virulência para a manutenção da sobrevivência do parasito nos hospedeiros vertebrados (FERNANDES *et al.*, 2012).

Esta vacina foi capaz de apresentar segurança e imunogenicidade em populações heterogêneas de cães, em estudos de fase II. Os cães vacinados e desafiados com *L. infantum*, produziram altos níveis de IgG total e IgG2, altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. Um estudo de fase III realizado em uma área endêmica no estado de Minas Gerais demonstrou que 96% dos cães vacinados com a Leish-Tec® não foram infectados, sendo assim, obtendo 70% de eficácia.

A vacina Leishmune® é uma vacina inativada de subunidade que contém um complexo glicoproteico purificado a partir de promastigotas de *L. donovani*, denominado FML (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2005; MIRÓ *et al.*, 2008). O adjuvante utilizado neste produto é a saponina *Riedel de Haen*. O antígeno FML é um complexo que inibe fortemente a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de forma espécie-específica (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 1993, 1994).

Os ensaios em modelo canino para avaliar a eficácia da vacina FML começaram em 1996 na área endêmica de São Gonçalo do Amarante, no estado do Rio Grande do Norte (RN) e, após dois anos de estudo, foi demonstrado 92% de proteção contra a LVC no grupo vacinado, o que corresponde a 76% de eficácia vacinal (DA SILVA *et al.*, 2000). Em um segundo estudo, também em área endêmica, 25% dos animais controle e 5% dos vacinados desenvolveram a doença, representando 95% de proteção em cães vacinados com a Leishmune® (BORJA-

CABRERA *et al.*, 2002). No entanto, a separação entre cães naturalmente infectados e cães vacinados com FML ainda é difícil, o que leva a certa relutância por parte dos médicos veterinários brasileiros em relação ao uso desta vacina. Por outro lado, dados ainda são necessários para maior avaliação crítica da Leishmune® na redução da capacidade de infecção de flebotomíneos por cães vacinados e na redução da doença em humanos nas regiões em que os cães são vacinados (MIRÓ *et al.*, 2008).

A Leishmune® administrada em cães saudáveis induz um aumento da produção de IFN- γ por linfócitos TCD8+. A secreção de IFN- γ e TNF- α , detectada por PCR em tempo real, está significativamente aumentada logo após a primeira dose de Leishmune®, quando comparada com a dos controles não tratados e infectados que expressam maiores níveis de IL-10, indicando a proteção precoce gerada pela vacina. Aumento de linfócitos TCD8+ foi detectado após vacinação (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008) e/ou imunoterapia (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004) com Leishmune®. A proteção gerada pela vacina está relacionada com um aumento dos linfócitos TCD8+ produtores de IFN- γ , com a produção de níveis elevados de NO (ARAÚJO *et al.*, 2008, 2009), a ativação precoce e persistente de neutrófilos e monócitos (ARAÚJO *et al.*, 2009), a secreção de IFN- γ por linfócitos TCD4+ (ARAÚJO *et al.*, 2011), a diminuição das contagens de linfócitos T CD4+/CD25+ e o aumento dos níveis de IFN- γ mas não de IL-4 (DE LIMA *et al.*, 2010).

2.4 NUCLEOSÍDEO HIDROLASE 36 – NH36

A glicoproteína de 36KDa de *L. donovani* é o antígeno específico principal do complexo FML contra o qual são dirigidos a maioria dos anticorpos monoclonais obtidos e os anticorpos humanos de pacientes com LV mas não com LT ou Doença de Chagas (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008). Quando isolada do parasita por métodos bioquímicos, é capaz de induzir 68% de proteção em camundongos contra a infecção por *L. donovani* (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008). Ela foi clonada no sistema de *Escherichia coli* revelando ser uma Nucleosídeo Hidrolase (NH36),

marcador sorológico da LVC (SANTANA *et al.*, 2001). A vacina de DNA contendo o gene da NH36 também foi capaz de proteger contra a infecção por *L. chagasi*, *L. mexicana* (AGUILAR-BE *et al.*, 2005) e *L. amazonensis* (SOUZA & PALATNIK-DE SOUZA, 2009), induzindo uma resposta Th1 com aumento da secreção de IFN- γ pelas células CD4+ (AGUILAR-BE *et al.*, 2005). As Nucleosídeos Hidrolases são ausentes em células de mamíferos (IOVANE *et al.*, 2008), e já foram descritas em mais de 420 microrganismos (BLAST 1999). A NH36 de *L. donovani* apresenta homologia significativa com as sequências de NHs de *L. major* (95%), *L. chagasi* (99%), *L. infantum* (99%), *L. tropica* (97%), *L. mexicana* (93%), *L. braziliensis* (84%), tornando-a um bom candidato para uma vacina polivalente contra ambas as leishmanioses: Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Cutânea.

A vacina Leishmune® composta por NH36 recombinante e saponina demonstrou ser imunogênica e gerar proteção cruzada contra a infecção por *L. mexicana* (AGUILAR-BE *et al.*, 2005). Sabendo que ambas as espécies apresentam alta homologia na sequência da NH, seria importante definir quais são os domínios peptídicos imunodominantes da proteína, cuja utilização poderia inclusive aumentar a potência de uma vacina, não somente contra a LV, mas também polivalente contra a LT.

Para ser eficaz contra a LV é reconhecido que a vacina deve incluir epítomos de célula T, combinados ou repetidos, capazes de induzir uma resposta protetora (KAYE & AEBISHER, 2011). Nas Leishmanioses, até o presente, poucos estudos identificaram regiões imunodominantes que induzam proteção mediada por linfócitos TCD4+ (NICO *et al.*, 2009, 2010; BERTHOLET *et al.*, 2009) ou TCD8+ (BASU *et al.*, 2007). Uma vacina recombinante ou sintética que contivesse o maior número de peptídeos derivados da NH36, que fossem reconhecidos pelos linfócitos TCD8+ e TCD4+, além de um bom adjuvante, seria, portanto, uma formulação ideal.

A NH36 é composta por 314 aminoácidos, 53% deles hidrofóbicos, o que revela uma grande probabilidade de encontrar entre eles epítomos para células T. Recentemente, três fragmentos da sequência da NH36 foram clonados e denominados de F1 (aminoácidos (a.a.) de 1 a 103); o F2 (a.a. 104 a 198) e o F3 (a.a 199 a 304) (NICO *et al.*, 2009, 2010), tendo sido identificados com auxílio de programas de predição (Syfpeithy e Protean Pad) de epítomos para linfócitos TCD4+.

TCD8+ e anticorpos. O peptídeo F3, mais externo, contém três epítopos preditos para linfócitos TCD4+. O F2 contém apenas dois e se mostra mais interno. Os epítopos para linfócitos TCD8+ estão localizados no F2 e F1 e os epítopos para anticorpos ao longo de toda a molécula.

Esplenócitos de camundongos imunizados com a proteína NH36 e desafiados com *L. infantum* expressavam IFN- γ e TNF- α apenas após a incubação com F3 e F1 (NICO *et al.*, 2009). Observou-se também que a proteção contra *L. infantum* está relacionada com o domínio C-terminal (F3) e é mediada principalmente por uma resposta de células TCD4+ com uma contribuição menor de células TCD8+ (NICO *et al.*, 2010). A imunização com F3 excedeu em $36,73 \pm 12,33\%$ a resposta protetora induzida pela proteína cognata NH36 (NICO *et al.*, 2010), potencializando assim a eficácia vacinal.

Nenhum estudo de avaliação da antigenicidade e da imunogenicidade desses peptídeos, entretanto, foi realizado até o momento com células de cães doentes ou saudáveis, ou ainda previamente imunizados com a Leishmune®. Esse tipo de avaliação torna-se de extrema importância para determinar se estes peptídeos poderiam compor uma nova formulação vacinal mais bem definida contra a LVC.

3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a LVC é uma doença de caráter zoonótico negligenciada, sendo um grave problema de saúde pública, uma vez que há indícios de que casos em cães precedem os casos humanos. Para impedir a disseminação desta doença, o Ministério da Saúde preconiza o diagnóstico, apreensão e eutanásia dos cães infectados. Os cães albergam o parasito no tegumento, tornando-se um reservatório acidental dos protozoários, e o tratamento com as drogas humanas poderia levar a indução de resistência parasitária e disseminação da doença humana com parasitas resistentes. O tratamento dos cães infectados ainda não é recomendado visto que os mesmos não podem ser tratados por medicamentos utilizados por humanos.

O grupo de pesquisadores do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ desenvolveram uma vacina denominada Leishmune®, licenciada em 2003. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da nota de esclarecimento em 2014, pronunciou-se sobre a remoção da comercialização dessa vacina, indicando a existência de ensaios clínicos de fase I e II, e a inexistência de ensaios de fase III conclusivos (**Anexo 1**).

A vacina Leishmune® contém a FML de *L. donovani*, a qual inibe fortemente a ligação de promastigotas em macrófagos, e o complexo glicoprotéico NH36 é o principal complexo antigênico do FML. Esta proteína foi subdividida em fragmentos de três peptídeos que são denominados: porção F1 ou C-terminal, porção F2 ou porção central, e porção F3 ou N-terminal.

Estudos sobre vacina estão galgando particularidades que antes eram inexistentes. Avanços recentes na vacinologia demonstram resultados promissores em relação aos estudos com peptídeos, para a formulação de vacinas. Neste sentido, Nico e colaboradores realizaram um ensaio *in vitro* com células de camundongos infectados por *L. amazonensis* e observaram que a porção F3 protege o camundongo contra a infecção (NICO *et al.*, 2010).

A presente dissertação avaliou a antigenicidade da proteína NH36 e seus peptídeos F1, F2 e F3 em células de cães saudáveis, cães vacinados com a vacina comercial Leishmune® e cães naturalmente infectados por *L. infantum*, para determinar se, posteriormente um estudo de fase III (eficácia) poderá ser desenvolvido com um desses peptídeos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a resposta imune induzida pela vacina Leishmune® em células obtidas do sangue periférico e no soro de cães imunizados e acompanhados durante um ano após a vacinação em comparação com as repostas observadas em cães saudáveis e cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através da técnica de ELISA, a resposta imune humoral específica para proteína vacinal NH36 e frações nos cães infectados e imunizados;
- Determinar no contexto *ex vivo*, por citometria de fluxo, o perfil de linfócitos T (CD4 e CD8+), linfócitos B CD21+ e células TCD4+CD25+ e TCD8+CD25+ provenientes do sangue periférico dos cães imunizados, comparando os resultados obtidos com os grupos de cães saudáveis e naturalmente infectados.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo se trata de uma coorte, em que 10 cães do 1º Batalhão de Polícia do Exército Brasileiro (BPE) foram submetidos à coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico de LVC, e para avaliação dos padrões sorológicos e celulares. Os animais que apresentaram resultado negativo para todos os testes de diagnóstico (DPP, Ensaio Imunoenzimático (ELISA), cultura parasitológica e qPCR) foram considerados saudáveis e incluídos no estudo.

Sendo assim, após o exame clínico e sedação, foram coletadas amostras biológicas dos cães (medula óssea e sangue) para a realização dos exames clínicos e coleta das amostras no tempo zero (T0), as quais foram identificadas como grupo controle (animais saudáveis). Posteriormente, esses animais foram imunizados com a vacina Leishmune® (Zoetis), respeitando o protocolo vacinal indicado pelo fabricante (3 doses num intervalo de 21 dias em cães a partir de 4 meses de idade). Após administração das três doses vacinais, os animais foram submetidos novamente a coleta de sangue nos intervalos de tempo identificados como: Tempo um (T1 - 30 dias após a 3ª dose da vacina), Tempo dois (T2 - 6 meses após a 3ª dose da vacina) e Tempo três (T3 - 1 ano após a 3ª dose da vacina), conforme demonstrado na **tabela 1**.

Tabela 1: Acompanhamento dos cães nos grupos T0, T1, T2 e T3

Tempo	Tempo após a vacinação	Número de cães
Tempo zero - T0	animais anterior a primeira dose	10
Tempo um - T1	30 dias após a última dose	10
Tempo dois - T2	6 meses após a última dose	10
Tempo três - T3	1 ano após a última dose	10

Foram incluídos no grupo de animais vacinados cães sadios de ambos os sexos, com faixa etária a partir de quatro meses e resultado negativo para o DPP®. Sob o critério de exclusão estão as fêmeas gestantes, cães imunocomprometidos por medicamento ou doença de base e positivos para LVC.

No grupo de animais naturalmente infectados por *L. infantum* (sintomáticos), foram incluídos seis cães provenientes do inquérito soroepidemiológico realizado no município de Barra Mansa no estado do Rio de Janeiro. Esses animais foram triados com os exames recomendados pelo Ministério da Saúde (DPP e ELISA), realizados no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro Noel Nutels (Lacen/RJ) e encaminhados para a eutanásia no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses-INI/Fiocruz (LAPCLIN-DERMZOO) sob recomendação do Ministério da Saúde.

5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Todos os cães deste estudo foram avaliados clinicamente por médicos veterinários do LAPCLIN-DERMZOO-INI/Fiocruz. Os animais dos grupos sadios e vacinados foram submetidos à coleta de amostras biológicas de medula óssea para realização da cultura parasitológica e qPCR, e coleta de sangue para realização de

exames sorológicos e citometria de fluxo; esses animais foram sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado à acepromazina (0,2 mg/kg) por via intramuscular.

No grupo naturalmente infectado, após sedação e coleta das amostras de medula óssea e sangue, os cães foram submetidos à eutanásia, onde se utilizou uma superdosagem de tiopental sódico intravenoso, até que as funções cardiorrespiratórias fossem interrompidas.

5.2.1 Coleta de sangue periférico e soro

Através de venopunção cefálica ou jugular a vácuo, utilizando escalpe vacutainer (BD®, EUA), foram coletados 2 mL de sangue sem anticoagulante para a realização do ELISA e 10 mL em um tubo contendo heparina para imunofenotipagem *ex vivo*. O tubo sem anticoagulante foi centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram aliqüotadas e armazenadas à temperatura de -80°C para posterior análises e detecção de anticorpos específicos.

5.2.2 Coleta de medula óssea

Após a sedação feita por médicos veterinários, foi realizada a tricotomia, limpeza com água e sabão, antissepsia com álcool a 70% e foi introduzido no manúbrio esternal, uma agulha 1,2 X 40 mm acoplada a uma seringa de 10 mL. O material aspirado foi, em parte, cultivado em meio de cultura NNN/Schneider e o restante acondicionado em microtubos de criopreservação e congelado à -20°C .

Foi utilizado como padrão de referência a associação das técnicas de qPCR e cultura parasitológica de aspirado de medula óssea. O animal foi considerado infectado quando pelo menos o resultado de uma das técnicas fosse positivo.

5.3 TESTES PARA DIAGNÓSTICO

5.3.1 Cultura parasitológica

As culturas de medula óssea foram conservadas em estufa biológica entre 26–28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco em microscopia óptica, buscando evidenciar formas promastigotas.

5.3.2 DPP – Dual Path Platform® – DPP® Leishmaniose

Visceral Canina

Foi coletado um volume aproximado de 5 µL de sangue da orelha para a realização do teste imunocromatográfico rápido DPP™ Leishmaniose Visceral Canina. O teste foi considerado positivo quando as duas faixas, uma referente à amostra, e a outra para o controle do teste, fossem visíveis. Este teste foi utilizado para o diagnóstico no Tempo 0 e como controle de soroconversão após a imunização.

5.3.3 PCR em tempo real (qPCR)

Para a extração do DNA de medula óssea foi utilizado o “kit” DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, os microtubos contendo DNA purificado foram identificados e estocados a -20°C . A sonda de hidrólise (TaqMan® MGB) e os *primers* foram desenhados para visar as regiões conservadas do KDNA de *L. infantum*. Os Iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda de hidrólise (FAM- 5'AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- NFQ-MGB) utilizadas foram descritos anteriormente no protocolo de Francino e colaboradores (2006).

As amostras foram amplificadas na plataforma StepOne™ (The Applied Biosystems®). O volume final da reação foi de 25 μL , sendo 5 μL de amostra e 20 μL de mix contendo 12,5 μL de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems®, Carlsbad, USA), 1,5 μL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900 nM, 2,5 μL da sonda a 200 nM e 2 μL de água ultra pura (Sigma- Aldrich®) na concentração de 5 μg . O protocolo dos ciclos foi: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e de 60°C por 1 minuto. A reação foi realizada em placa de 48 poços (The Applied Biosystems®) que foi vedada com filme adesivo (The Applied Biosystems®) após a pipetagem da reação.

Em cada amplificação foram usados controles positivos e negativos e o *threshlod* determinado foi de 0,1 para todas as amostras, pela determinação do ponto em que a fluorescência emitida ultrapassou o limite considerado negativo. O limite para a obtenção dos resultados detectáveis foi fixado em 37 ciclos. As amostras que amplificaram após o ciclo 37 foram consideradas indetectáveis.

5.3.4 Ensaio imunoenzimático - ELISA

Este teste foi realizado caso o DPP fosse positivo em algum tempo, conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil. Para pesquisa de anticorpos específicos anti-*Leishmania* foi utilizado o “kit” EIE-leishmaniose-BioManguinhos (EIE-LC) que usa como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF) produzidos por Bio-Manguinhos/Fiocruz, seguindo-se as especificações do fabricante.

5.4 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos recombinantes de *L. donovani*: NH36, F1, F2 e F3, assim como a proteína quimérica F1|F2 e F1|F3 foram obtidos conforme descrito por NICO *et al.*, 2010 e gentilmente cedidos pela Dra Clarisa Palatnik de Sousa do Instituto de Microbiologia Paulo Góes - UFRJ.

5.5 SOROLOGIA PARA IgG TOTAL

As microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno da proteína NH36, suas frações F1, F2 e F3 e suas quimeras F1|F2 e F1|F3, (nas concentrações de 1 µg/mL para todos os antígenos) independentemente, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M com pH 9.5 e incubadas *overnight* em câmara úmida à 4°C.

Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com 200 μ L por poço de solução Tampão Fosfato Salínico (PBS) 0,15 M pH 7.2 contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-tween). Para o bloqueio de ligações inespecíficas, foi utilizada uma solução de leite em pó desnatado, tipo MOLICO®, a 10% em PBS. Os soros foram diluídos em PBS-MOLICO numa diluição de 1:100. Após a pipetagem dos soros nos poços, em triplicata, as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora à 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-tween, e posteriormente, foi adicionado o conjugado (*Peroxidase-Labeled Proteína A*, na concentração de 1 μ g/mL) nos poços. A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora à 37°C.

Em seguida, foi adicionada a solução reveladora contendo o substrato (H_2O_2 peróxido de hidrogênio a 3%) e o cromógeno (Orto-Fenileno-Diamina - OPD numa concentração de 10 mg/mL), sendo pipetado o volume de 100 μ L por poço, seguido de incubação em temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz. A reação foi interrompida com 50 μ L de H_2SO_4 - ácido sulfúrico 2M por poço, e logo após foi realizada a leitura da absorbância em filtro de 490 nm.

5.6 ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR EM *EX VIVO* POR CITOMETRIA DE FLUXO

5.6.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Após os procedimentos de coleta, as amostras de sangue heparinizado foram armazenadas em gelo sintético, e levadas imediatamente para o laboratório, para então, iniciar o procedimento de separação das CMSP.

O sangue foi diluído na proporção de 1:1 em meio RPMI completo: meio RPMI 1640® (Gibco, EUA) contendo 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 50 μ M β -

Mercaptoetanol, 100 U/mL Penicilina, 100 µg/mL Streptomicina (Todos da marca Sigma®, EUA). Em um tubo de 50 mL (Corning Costar®, EUA), foi colocada uma proporção ficoll/sangue diluído de 1:2 e, posteriormente, o tubo foi centrifugado 1245 g por 20 minutos à 20°C sem freio (HERAEUS®, UK). Após a centrifugação, houve a formação de um anel contendo as CMSP que foram coletadas com o auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, as CMSP foram lavadas duas vezes a 500 g por 10 minutos a 4°C em meio RPMI completo. As células foram então ressuspensas em 2 mL de meio RPMI completo para a contagem no hemocitômetro de Neubauer na diluição de 1:100 com corante vital Azul de Trypan (Sigma®, EUA).

Após a contagem, uma parte das células foi ajustada para a concentração de 1×10^7 células/mL em tampão de congelamento, constituído por 10% de Dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma®, EUA) e 90% de Soro Fetal Bovino – SFB (Gibco®, América do Sul), e armazenadas em microtubos de criopreservação (Nunc, EUA), colocadas em recipiente com álcool isopropílico em congelamento lento (Mr Frosty) no freezer -80°C *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram transferidos para container de nitrogênio líquido.

5.6.2 Descongelamento de células

Os microtubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido, e descongelados em Banho Maria à 37°C. Em seguida, o volume de células contidas nos microtubos, foi vertido em tubos de 15 mL de polipropileno (Corning®, EUA) sendo adicionado meio RPMI completo, suplementado com 10% de SFB para as sucessivas lavagens. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo suplementado com 10% SFB e, posteriormente, tiveram sua concentração celular determinada por contagem em hemocitômetro de Neubauer conforme descrito acima. Após contagem de células viáveis e mortas, apenas amostras com viabilidade superior a 95% tiveram sua concentração ajustada para 3×10^6 a 1×10^7 células/mL em meio RPMI completo suplementado com 10% SFB, para a realização de ensaios de imunofenotipagem *ex vivo*.

5.6.3 Marcação de superfície para análise fenotípica *ex vivo* por citometria de fluxo

Um total de 3×10^5 a 1×10^6 células por poço foram adicionadas a placas de 96 poços de fundo em U (Nunc®, EUA). As células de um mesmo animal nos diferentes tempos de estudo foram utilizadas em um mesmo ensaio. Para tal, cada amostra foi ensaiada em duplicata. Após centrifugação das placas a 500 g por 10 minutos a 4°C, um poço de cada amostra foi identificado como controle negativo, e as células ressuspendidas em 30 µL de tampão de marcação PBS contendo 0,1% de albumina bovina sérica - BSA (Sigma®, EUA). O outro poço de cada amostra recebeu 30 µL do *mix* de anticorpos monoclonais para marcação das moléculas de superfície para imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos, que estão descritos na (tabela 2).

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para análises de perfil celular. Todos os anticorpos monoclonais são provenientes da Serotec (Oxford, Inglaterra).

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Diluição	Fenótipo alvo	Descrição
CD3	FITC	CA17.2A12	1:40	Linfócitos T	<i>Mouse anti-canine</i>
CD4	PECy.7	YKIX302.9	1:40	Linfócitos T CD4	<i>Rat anti-dog</i>
CD8	Alexa Fluor 700	YCATE55. 9	1:5	Linfócitos T CD8	<i>Rat anti-dog</i>
CD25	PE	P4A10	1:40	Linfócitos T ativados	<i>Mouse anti-canine</i>
CD21	Alexa Fluor 647	CA2.1D6	1:40	Linfócitos B	<i>Mouse anti-canine</i>

Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura 4°C, em ausência de luz por 30 minutos. Após esse período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de tampão de marcação (PBS/BSA) a 500 g por 5 minutos e, a seguir, ressuspensas em 200 µL de tampão de marcação e transferidas para mini-tubos de 1 mL (Nuclon®, EUA), a fim de que as células fossem levadas para a aquisição no citômetro de fluxo CytoFlex (BeckmanCoulter, CO, EUA), que pertence à plataforma de citometria de fluxo, núcleo de *sorting* do IOC/Fiocruz. Um total de 30000 eventos foi adquirido dentro do *gate* de linfócitos e os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo X.01 (Flow Cytometry Analyses Software, Tree Star, EUA). A população de linfócitos foi definida a partir da criação de uma região (*gate*) em gráfico de *dot plot* baseado no tamanho no eixo “x” (FSC: *forward scatter*) versus granulosidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y”. Os resultados referentes aos aspectos fenotípicos analisados em relação às populações e subpopulações de linfócitos foram obtidos através da frequência (%) de linfócitos TCD3+, de subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e de linfócitos B (CD21+), conforme esquema demonstrativo da **figura 5**.

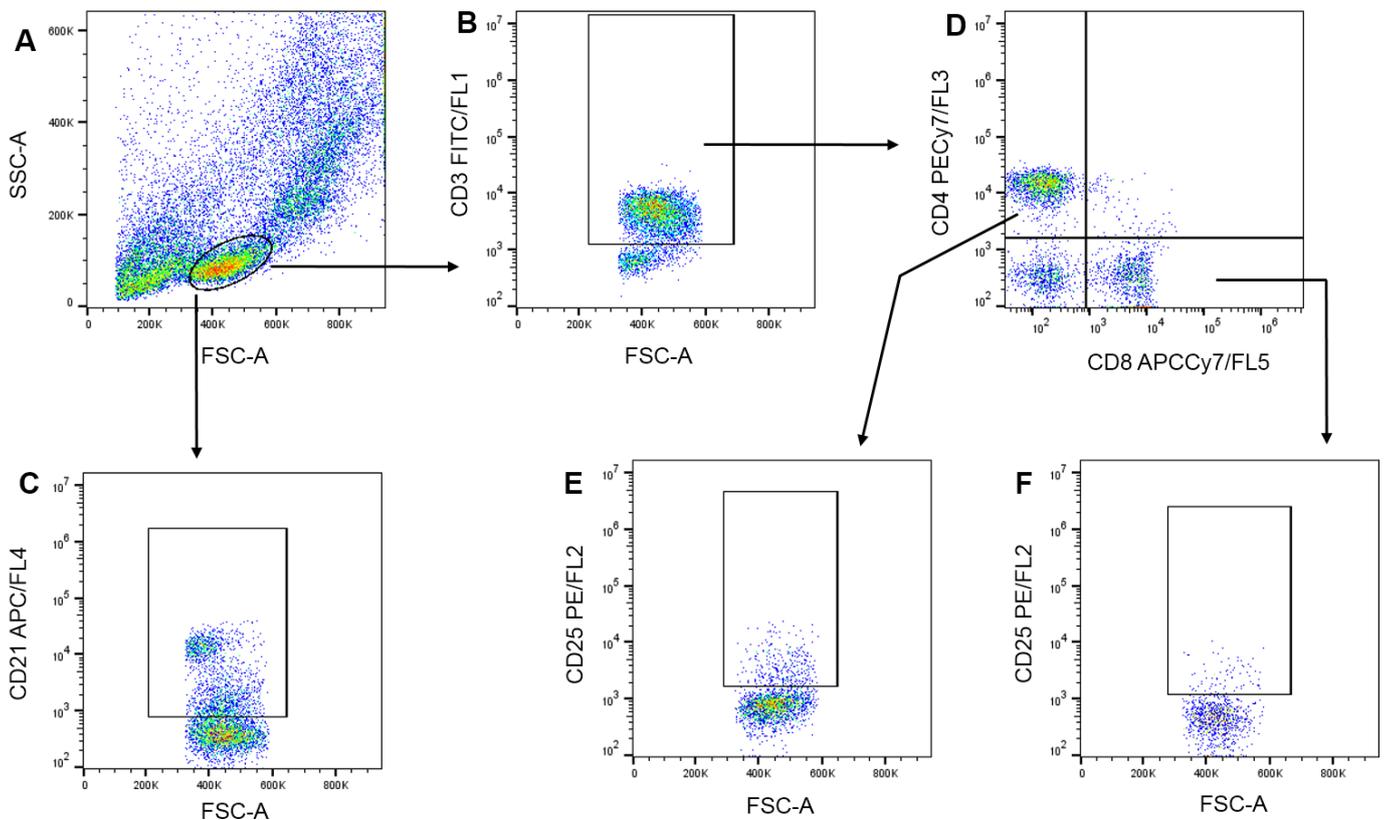


Figura 5: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B (CD21+), linfócitos T CD3+CD4+ e T CD3+CD8+ assim como as subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+CD25+ e CD3+CD8+CD25+ no sangue periférico de cães saudáveis, imunizados nos 3 tempos de estudo ou naturalmente infectados. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1 com fenótipo FSC_{Low} SSC_{Low}. (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL1 versus FSC, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de linfócitos T totais ou (C) linfócitos B totais (CD21/FL4) (D) Gráficos de distribuição pontual CD4/FL3 versus CD8/FL5, contendo as células selecionadas positivas para CD3, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T CD3+. (E) e (F) Gráficos de distribuição pontual de CD25/FL2 versus FSC, provenientes da região contendo as células TCD3+CD4+ ou TCD3+CD8+.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo tem autorização do comitê de ética para uso de animais em laboratório – CEUA/IOC nº L-045/2015 (animais sadios e vacinados – **Anexo 2**) e CEUA/Fiocruz nº LW-4/17 (animais naturalmente infectados – **Anexo 3**), para a realização das coletas de amostras dos animais e posterior experimentação dos mesmos.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises dos resultados utilizamos o programa GraphPad Prism 5.0 (EUA), e os testes não paramétricos de Wilcoxon (comparação de amostras pareadas de um mesmo animal com diferentes estímulos) e Mann-Whitney (entre amostras de grupos diferentes – vacinados x LVC). Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

6.1 TESTES DE DIAGNÓSTICO

Os dez cães avaliados neste estudo para inclusão no grupo controle apresentaram resultados negativos para os testes empregados, formando assim o grupo T0 de cães sadios (**Tabela 3**). Os seis cães naturalmente infectados utilizados foram provenientes de Barra Mansa, no interior do estado do Rio de Janeiro. A sorologia e cultura parasitológica foram feitas pelo LACEN/ Centro de zoonoses, entretanto, foram repetidos no LAPCLIN-DERMZOO-INI/Fiocruz (**Tabela 4**).

Tabela 3: Diagnóstico para o critério de inclusão dos cães sadios, T0. Exames de acompanhamento para os mesmos cães nos tempos: T1, T2 e T3. Positivo (+) Negativo (-).

Cães	ELISA- BioManguinhos	qPCR	Cultura	DPP-T0	DPP-T1	DPP-T2	DPP-T3
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4: Cães naturalmente infectados provenientes de Barra Mansa-RJ e que posteriormente foram submetidos à eutanásia. Positivo (+) Negativo (-).

Cães	ELISA - BioManguinhos	qPCR	Cultura	DPP
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+

6.2 DETECÇÃO DE IgG TOTAL ESPECÍFICA PARA PROTEÍNA NH36 E FRAÇÕES

O grupo de cães vacinados provenientes do 1º Batalhão de Polícia do Exército Brasileiro apresentou níveis diversos de IgG específica para NH36 e suas frações, durante o período de acompanhamento (T0 ao T3). Para a proteína NH36, observamos que os níveis expressos de IgG total foram menores no T0 (antes da imunização) quando comparados com os demais tempos de estudo após a vacinação e em relação ao grupo dos cães naturalmente infectados (**Figura 6**). Para as frações F1, F2 e F3, os níveis de produção de IgG foram bastante heterogêneos. A fração F2 no T0 induziu níveis aparentemente mais elevados de anticorpos quando comparado com as demais frações, quimeras, e até mesmo a proteína NH36. No entanto, a expressão desta fração no T1 se assemelha à expressão no grupo dos cães naturalmente infectados. Observamos também que a indução de anticorpos IgG totais específicos para a proteína NH36 e suas frações ou quimeras possui um pico de produção no T1, decrescendo posteriormente, com exceção dos anticorpos para F3 que permanecem elevados em todos os tempos avaliados após a vacinação, atingido níveis semelhantes àqueles detectados nos soros de cães infectados (LVC). Por outro lado, no caso da fração F1, não observamos diferenças significativas após a vacinação em todos os tempos estudados, indicando a baixa capacidade desta fração em induzir anticorpos da classe IgG. Esta baixa produção de anticorpos específicos para F1 também foi observada no grupo de cães infectados. Os

antígenos recombinantes quiméricos F1|F2 e F1|F3 apresentaram altos níveis de IgG no T1, que decaíram rapidamente, atingindo níveis baixos após 6 meses e um ano de imunização. Paralelamente detectamos níveis elevados de anticorpos específicos para as quimeras no soro dos cães sintomáticos (**Figura 6**).

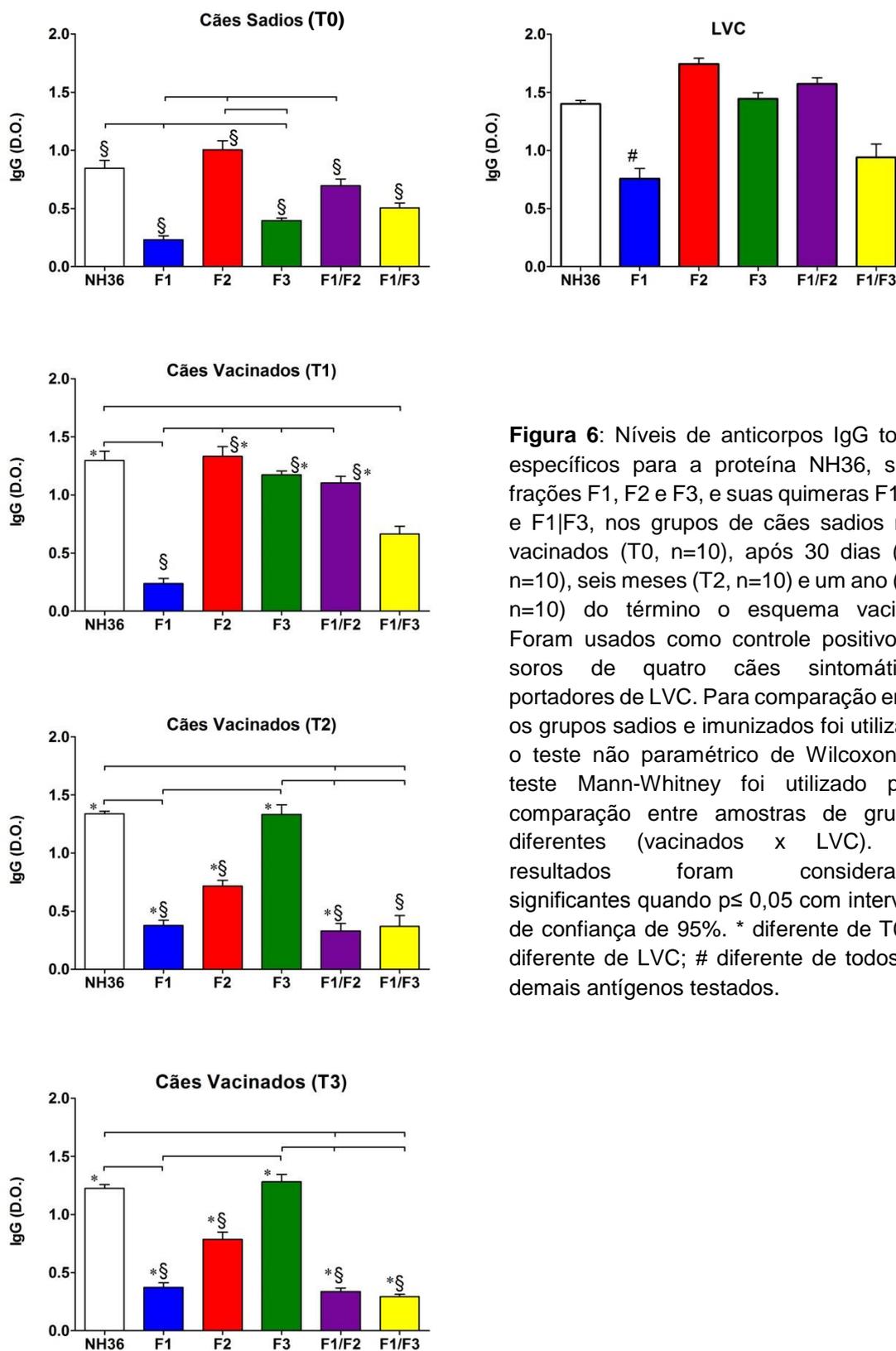


Figura 6: Níveis de anticorpos IgG totais específicos para a proteína NH36, suas frações F1, F2 e F3, e suas quimeras F1|F2 e F1|F3, nos grupos de cães sadios não vacinados (T0, n=10), após 30 dias (T1, n=10), seis meses (T2, n=10) e um ano (T3, n=10) do término o esquema vacinal. Foram usados como controle positivo os soros de quatro cães sintomáticos portadores de LVC. Para comparação entre os grupos sadios e imunizados foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre amostras de grupos diferentes (vacinados x LVC). Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%. * diferente de T0; § diferente de LVC; # diferente de todos os demais antígenos testados.

6.3 FENOTIPAGEM CELULAR *EX VIVO* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para os experimentos *ex vivo*, foram utilizadas as amostras de seis cães acompanhados durante um ano após a imunização nos tempos: T0, T1, T2 e T3, conforme descrito previamente; e cinco cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

No grupo de cães sadios (T0) e cães vacinados (T1, T2 e T3) com a Leishmune®, acompanhados durante um ano conforme o protocolo vacinal foi possível notar uma tendência na diminuição do percentual de células TCD3+CD4+ após a vacinação, porém essa diferença foi significativa apenas entre o grupo controle (T0) e os animais do grupo imunizado avaliados seis meses após a vacinação. Com relação a frequência de células TCD3+CD8+ não foram observados diferenças entre o grupo de animais sadios e os grupos de animais vacinados, mas estas células estavam aumentadas significativamente ($p < 0,05$) no sangue periférico do grupo de cães naturalmente infectados com sintomatologia, em comparação com todos os outros grupos testados (**Figura 7**).

Não observamos diferenças nos percentuais de células T CD4+CD25+, quando comparamos os grupos de animais sadios, vacinados e cães infectados. Por outro lado, os percentuais de linfócitos T CD8+CD25+ se encontram significativamente mais baixos no grupo de cães infectados sintomáticos, quando comparados os grupos de animais sadios e vacinados ($p < 0,05$).

Com relação aos linfócitos B, a vacina Leishmune® demonstrou uma tendência a diminuição nos percentuais deste tipo celular no decorrer do período pós-vacinal, mais marcante um ano após a vacinação. A diminuição no percentual de linfócitos B CD21+ foi muito mais dramática no grupo de cães infectados que apresentaram percentuais significativamente mais baixos que os observados nos animais sadios e nos animais vacinados nos 3 tempos de estudo ($p < 0,05$).

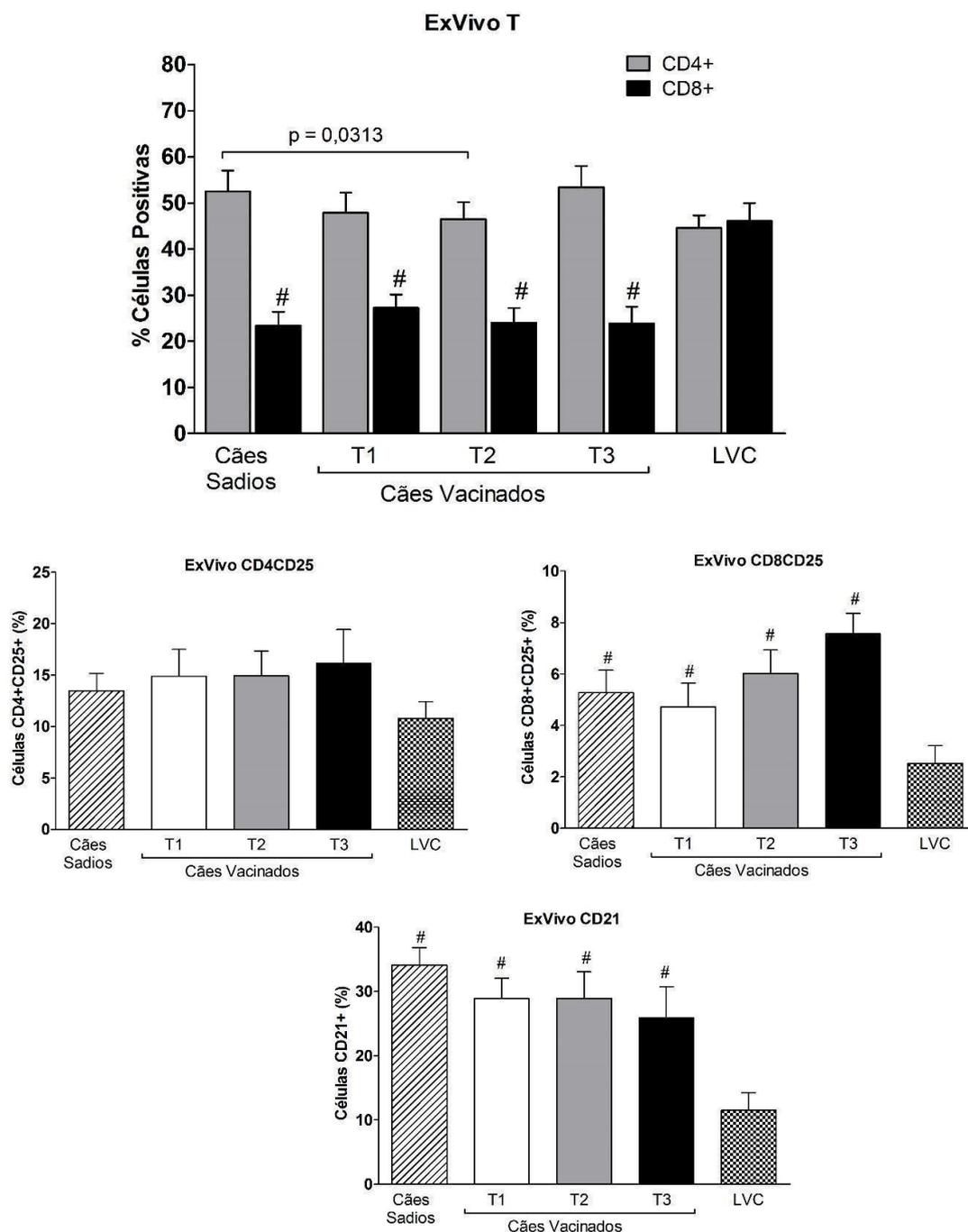


Figura 7: Avaliação *ex vivo* dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães saudáveis não vacinados (T0, n=6), após 30 dias (T1, n=6), seis meses (T2, n=6) e um ano (T3, n=6) de aplicação do esquema vacinal. Os resultados foram comparados com aqueles observados no sangue periférico de cinco cães sintomáticos diagnosticados com LVC. Para comparação entre os grupos saudáveis e imunizados foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre amostras de grupos diferentes (vacinados x LVC). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$; # diferente de LVC.

7 DISCUSSÃO

A Leishmune® foi a primeira vacina veterinária a ser licenciada pelo MAPA e a ser produzida no Brasil. Seu protocolo de imunização consta de três doses da vacina com o intervalo de 21 dias, tendo um reforço anualmente. Estudos demonstraram eficácia e segurança nos ensaios clínicos de fase III (DA SILVA *et al.*, 2000; PARRA *et al.*, 2007), entretanto, ainda não se compreende totalmente acerca das funções fenotípicas dos padrões imunológicos dos animais vacinados após o reforço anual.

A vacina Leishmune® é composta pelo FML, que possui em seu complexo antigênico a enzima NH36, que cliva os nucleosídeos exógenos para a liberação das pirimidinas ou das purinas para a síntese de DNA e replicação do parasita, esta enzima é um antígeno presente na infecção parasitária (NICO *et al.*, 2010). Recentemente, Nico e colaboradores selecionaram e produziram fragmentos recombinantes desta enzima, as porções F1 (domínio N-terminal) F2 (domínio central) e F3 (domínio C-terminal), os quais foram utilizados para a vacinação em camundongos infectados por *L. infantum* (NICO *et al.*, 2014).

No presente trabalho nos focamos em avaliar os aspectos fenotípicos e funcionais de linfócitos T e B, e a produção de anticorpos em cães imunizados com a vacina Leishmune® acompanhados durante um ano após a conclusão do esquema vacinal.

A detecção de anticorpos IgG foi realizada pelo método de ELISA, onde avaliamos a indução de anticorpos IgG específicos para a proteína NH36, suas frações F1, F2 e F3 e suas quimeras F1|F2 e F1|F3 no soro de cães vacinados nos quais encontramos uma alta produção de anticorpos IgG específicos para NH36 e pra sua fração C-terminal, F3. Nossos resultados demonstraram que as porções F2 e F3 estimulam níveis mais elevados de IgG do que a porção F1, tendo sido a porção F1 incapaz de induzir produção significativa de anticorpos IgG nos cães vacinados

quando comparados aos cães sadios (T0) além de induzir níveis baixos de IgG nos cães sintomáticos portadores de LVC. Em um estudo realizado em camundongos, os autores encontraram maior produção de IgG específica para a enzima NH36 e porções F2 e F3, corroborando nossos resultados (NICO *et al.*, 2014).

Por outro lado, detectamos níveis elevados de anticorpos específicos para a proteína NH36 e para a fração F2 no soro de animais sadios sem infecção prévia. Esses achados apontam para uma possível reação cruzada da proteína NH36 de *L. donovani* com as nucleosídeos hidrolases presentes em outros protozoários, fungos e bactérias, que pode estar mais bem representada na fração F2.

A quimera F1|F2 induz uma produção de IgG um pouco mais elevada no T1 quando comparada com a quimera F1|F3. No entanto, a expressão de anticorpos para quimera F1|F2 diminui em relação a proteína NH36 e sua fração F3 nos demais tempos estudados.

Podemos observar que a porção F3 remete a um aumento de resposta específica em cães vacinados com a Leishmune®, assim como em camundongos (NICO *et al.*, 2014), já que os anticorpos produzidos por cães vacinados com a Leishmune®, respondem principalmente com as porções F2 e F3. Saraiva e colaboradores demonstraram que a resposta imune humoral gerada pela vacina Leishmune® protege os flebotomíneos contra a infecção de *L. infantum*, e que a vacina gera uma forte resposta celular e humoral em cães expostos ou infectados com *L. infantum*, o que poderia reduzir as condições de animais reservatório nos animais imunizados (SARAIVA *et al.*, 2006).

A vacina Leishmune®, além de gerar uma resposta humoral, também produz uma resposta imune adaptativa, com a presença de linfócitos T e B (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; NICO *et al.*, 2010). Os nossos resultados de citometria *ex vivo* demonstraram que cães vacinados possuem percentuais de linfócitos TCD3+CD4+ e TCD3+CD8+ semelhantes aos observados nos cães sadios (T0). Por outro lado, em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, observamos um percentual significativamente maior de células TCD8+ em comparação aos animais sadios e vacinados. Em ensaios *in vitro*, foi observado que esplenócitos de camundongos vacinados com a NH36 expressaram altos níveis de CD4+ e baixos níveis de CD8+ (NICO *et al.*, 2014).

O papel de linfócitos TCD8+ em cães naturalmente infectados assintomáticos e em cães com baixa carga parasitária mostrou ser uma característica fenotípica apontando uma correlação com a proteção natural (REIS *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* informam o aumento de células CD8+ após a vacinação com Q saponaria-saponina presente nas vacinas: FML-QuilA, FML-saponina R, Leishmune® e vacina de lisado de *L. braziliensis*-saponina (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; GIUNCHETTI *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008).

De acordo com estudo anterior, os níveis de células T regulatórias específicas para parasitos no tecido linfoide secundário estão reduzidos quando comparados com os controles, o que pode ser indicativo de um êxito parcial em camundongos vacinados contra a Leishmaniose (CARRIÓN *et al.*, 2008). Conforme o estudo *in vitro* de Lima e colaboradores, as porcentagens das células CD4+CD25+ diminuem significativamente após dez dias de imunização, por outro lado, as porcentagens de células CD8+CD25+ foram semelhantes antes e após dez dias de imunização (DE LIMA *et al.*, 2010).

Em relação aos níveis de células CD4+CD25+ neste estudo, observamos que não existe diferença significativa nos percentuais dessas células nos grupos estudados, por outro lado, um ano após a vacinação podemos notar que existe uma tendência ao aumento dessa população de células CD4+. O percentual desses tipos celulares em animais naturalmente infectados com a *L. infantum* mostra-se mais baixo do que em animais sadios e vacinados, porém sem atingir níveis de significância estatística. É possível que com o aumento amostral, ou seja, quando tivermos os resultados dos ensaios com células dos dez cães incluídos no estudo, essa diferença demonstre significância estatística. Além disso, como o marcador CD25+ é expresso tanto em células ativadas como em células CD4+ regulatórias, pretendemos realizar ensaios posteriores para determinar a marcação do fator de transcrição FoxP3 na população de células CD4+CD25+ a fim de entender melhor sua função.

Por outro lado, foi possível notar uma tendência ao aumento do fenótipo de linfócitos TCD8+CD25+ no grupo de animais imunizados, principalmente um ano após a vacinação, existindo a possibilidade de que essa tendência possa ser estatisticamente comprovada com o aumento do número de amostras estudadas de

6 para 10. Além disso, nossos resultados demonstraram claramente o menor percentual de linfócitos TCD8+CD25+ nos cães sintomáticos quando comparados aos animais imunizados e aos cães sadios antes da imunização. É interessante ressaltar que essa diminuição ocorre paralelamente ao aumento do fenótipo TCD3+CD8+. Desta forma essa diminuição no percentual de células TCD8+CD25+ pode ser apenas um reflexo da indução elevada de células CD8 imaturas que não apresentam o marcador CD25 na sua superfície. Estudos posteriores serão realizados por nosso grupo para avaliar melhor a função desse tipo celular.

De maneira inversa, nossos resultados sugerem que animais vacinados apresentam uma tendência a diminuição dos percentuais de linfócitos B circulantes nos tempos estudados, apresentando queda no percentual dessas células no sangue periférico dos animais um ano após a vacinação. Nos cães infectados, observamos baixo percentual de células B, com diferenças significantes em comparação aos animais sadios e vacinados. De acordo com estudos anteriores, os níveis de CD21+ são altos em cães vacinados com a vacina Leishmune®, (ARAÚJO *et al.*, 2008, BORJA-CABRERA *et al.*, 2008) e em cães vacinados com a vacina *L. braziliensis*-saponina, a qual utiliza o mesmo adjuvante da vacina Leishmune® (GIUNCHETTI *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que a população de linfócitos B aumenta após a vacinação com a Leishmune®, e sugerem que essas células não estão relacionadas somente com a expansão da resposta humoral, mas também estão relacionadas com a proteção e bloqueio da transmissão de LV no campo (NIETO *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2003; SARAIVA *et al.*, 2006).

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, tanto na avaliação do perfil de linfócitos T e B no contexto *ex vivo*, quanto na produção de anticorpos IgG totais para a proteína total e suas frações, principalmente para a fração F3, observou perfis similares em cães após seis meses e um ano da vacinação. Essas quimeras podem ser agentes em potencial para a vacina Leishmune®, no entanto, para que isso aconteça, é necessário mais estudo para entender o comportamento dessas quimeras em células de cães sadios, vacinados e naturalmente infectados por *L. infantum*.

8 CONCLUSÕES

- A vacina Leishmune® induz a produção de anticorpos IgG totais para os antígenos recombinantes específicos estudados. No entanto, a fração F1 induziu níveis baixos de IgG mesmo nos animais sintomáticos, enquanto as frações F2 e F3 induziram produção crescente e demonstraram níveis constantes de IgG específica após 6 meses (T2) e 1 ano (T3) do término do protocolo vacinal;
- No grupo de cães sadios e não vacinados, observamos a indução de anticorpos IgG totais específicos, que foram mais elevados para a proteína NH36 e sua fração F2. Esses resultados podem indicar uma possível reação cruzada da NH36 de *L.donovani* com as nucleosídeos hidrolases presentes em outros protozoários, fungos e bactérias;
- O grupo de animais infectados obteve uma baixa indução de anticorpos IgG totais para a fração F1, diferentemente das demais frações e quimeras;
- Nos experimentos para a avaliação *ex vivo* do perfil de células T e B presentes no sangue periférico dos animais imunizados observamos uma tendência no aumento do percentual de células TCD8+CD25+ circulantes (possivelmente células ativadas) e uma diminuição significativa nos percentuais de linfócitos B circulantes em relação ao grupo controle.
- No grupo de animais sintomáticos observamos um maior percentual de células CD8+ circulantes no sangue periférico quando comparado com os animais sadios e no grupo imunizado, porém essas células não parecem ser células ativadas, visto que poucas expressam o marcador de ativação CD25.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Ed.). 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 564.

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **The Journal Parasitology.**, v. 77, n. 4, p. 557-561, 1991.

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology.**, v. 121, n. 3-4, p. 179-187, 2004.

AGUILAR-BE, I.; ROSADO-VALLADO, M.; MUT-MARTIN, M.; GARCIA-MISS, M. R.; PALATINIK-DE-SOUSA, C. B.; DUMONTEIL, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. **Infection and Immunity.**, v. 73, n. 2, p. 812-819, 2005.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Evaluation of the immune response and production of interferon in canine visceral leishmaniasis. **Revue Medicine Veterinaire.**, v. 150, n. 10, p. 809-814, 1999.

ARAÚJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; SATHLER-AVELAR, R.; et al. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine.**, v. 26, n. 18, p. 2211-2224, 2008.

ARAÚJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M. C.; VIANNA, L. R.; et al. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. **Vaccine.**, v. 27, n. 7, p. 1008-1017, 2009.

ARAÚJO, M. S.; DE ANDRADE, R. A.; SATHLER-AVELAR, R.; MAGALHÃES, C. P.; CARVALHO, A. T.; ANDRADE, M. C.; et al. Immunological changes in canine

peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, n. 1-2, p. 64-75, 2011.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, n. 3, p. 104-105, 1992.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews of Immunology**, v. 4, p. 499-511, 2004

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BASANO, A. S.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BASU, R.; ROY, S.; WALDEN, P. HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. **The Journal Infectious Diseases**, v. 195, n. 9, p. 1373-1380, 2007.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERN, C.; HAQUE, R.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; KURKJIAN, K. M.; VAZ, L.; et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n.5, p. 909-914, 2007.

BERTHOLET, S.; GOTO, Y.; CARTER, L.; BHATIA, A.; HOWARD, R. F.; CARTER, D.; et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v. 27, n. 50, p. 7036-7045, 2009.

BLANK, C.; BOGDAN, C.; BAUER, C.; ERB, K.; MOLL, H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 4, p. 792-796, 1996.

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2010.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p.3277-3284, 2002.

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, W.; OKADA, L. Y. H.; TRIVELLATO, F. A. A.; KAWASAKI, J. K. A.; et al. Effective Immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine.**, v. 22, n. 17-18, p. 2234-2243, 2004.

BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; BAUER, F. S.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; MORGADO, A. A.; et al. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine.**, v. 26, n. 39, p. 4991-4997, 2008.

BOTTINO, C. R.; CASTRICONI, R.; MORETTA, L.; MORETTA, A. Cellular ligands of activating NK receptors. **Trends in Immunology.**, v. 26, p. 221-226, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 3. edição Brasília: Ed. MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0742-4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. edição. atualizada. Brasília: Ed. MS, 2010. 180 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Ed.). **Flebotomíneos do Brasil**. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 257-274.

CALDAS, A. J.; COSTA, J. M.; SILVA, A. A.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 96, n. 1, p. 21-28, 2002.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. **Vaccine.**, v. 26, n. 20, p. 2537-2544, 2008.

CARRILLO, E.; AHMED, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; NIETO, J.; OSORIO, Y.; TRAVI, B.; et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine.**, v. 25, n. 8, p. 1534-1543, 2007.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology.**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology.**, v. 4, p. 336-347, 2004.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.**, v. 6, n. 3, p. 175-182, 2001.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids.**, v. 40, n. 2, p. 269-285, 2011.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública.**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.**, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DE SOUZA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine.**, v. 19, n. 9-10, p. 1082-1092, 2000.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology.**, v. 147, n. 1-2, p. 2-8, 2007.

DE CAMPOS, M. P.; DA SILVA, D. A.; MADEIRA, M de F.; VELHO, A. A Jr, FIGUEIREDO, F. B. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária.**, v. 22, n. 3, p. 424-426, 2013.

DE LIMA, V. M.; IKEDA, F. A.; ROSSI, C. N.; FEITOSA, M. M.; VASCONCELOS, R. O.; NUNES, C. M.; GOTO, H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 135, n. 3-4, p. 296-302, 2010.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L.; et al. Evaluation of the sensibility and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine.**, v. 17, n. 9-10, p. 1179-1185, 1999.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; PINTO, J. A.; COUTINHO, S. G.; SANTIAGO, M. A.; TOLEDO, V. P.; et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica.**, v. 80, n. 3, p. 251-260, 2001.

DE PAULA, C. C.; FIGUEIREDO, F. B.; MENEZES, R. C.; MOUTA-CONFORT, E.; BOGIO, A.; MADEIRA, M de F. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 42, n. 1, p. 77-78, 2009.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology.**, v. 17, n. 9, p. 451-458, 1995.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 95, n. 5, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). **Bogliolo Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1215-1275.

DUARTE, C. S. Leishmaniose: que futuro nos reserva? Porto, Portugal: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto, 2009. (**Relatório Final de Mestrado Integrado**).

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F; MICHALICK, M. S.; FREITAS, E.; GAZZINELLI, R. T. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine.**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI, G. J.; GAZZINELLI, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 15, n. 4, p. 476-485, 2012.

FIGUEIREDO, F. B.; BARBOSA FILHO, C. J.; SCHUBACH, E. Y.; PEREIRA, S. A.; NASCIMENTO, L. D.; MADEIRA, M. F. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 43, n. 1, p. 98-99, 2010.

FLAJNIK, M. F.; DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends in Immunology.**, v. 25, p. 640-644, 2004

GAMA, M. E; COSTA, J. M.; PEREIRA, J. C.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas.**, v. 37, n. 1, p. 129-136, 2004.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology.**, v. 135, n. 2-3, p. 100-107, 2006.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine.**, v. 25, n. 44, p. 7674-86, 2007.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with

parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science.**, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

GUEMONPREZ, P.; VALLADEU, L.; ZITVOGEL, C.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology.**, v. 20, p. 621-667, 2002.

IOVANE, E.; GIABBA, B.; MUZZOLINI, L.; MATAFORA, V.; FORNILI, A.; MINICI, C.; et al. Structural basis for substrate specificity in group I nucleoside hydrolases. **Biochemistry.**, v. 47, n. 15, p. 4418-4426, 2008.

JAIN, K; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discov Today.**, v. 18, n. 23-24, p. 23-24, 2013.

JAIN, K; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods.**, v.422, p.1-12, 2015.

JANEWAY, C. A.; MEZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology.**, v. 20, p. 197-216, 2002

JERÔNIMO, S. M.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, Ad.; THIELKING, P.; PEARSON, R. D.; EVANS, T. G. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long- term follow-up. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 30, n. 3, p. 608-609, 2000.

KAMESIPOUR, A; RAFATI, S; DAVOUDI, N; MABOUDI, F; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. **The Indian Journal of Medical Research.**, v. 123, n. 3, p. 423-438, 2006.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection.**, v. 17, n. 10, p. 1462-1470, 2011.

LAINSON, R.; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.**, v. 206, n. 1164, p. 307-318, 1979.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 79, n. 3-4, p. 273-284, 2001.

LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. Macrophage killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology.**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990.

LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; VASCONCELOS, R. O. IL-6 e TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v.115, n. 1-2, p. 189-193, 2007.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; FRANKHAUSER, J. E.; NELSON, C. S.; SADICK, M. D. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 2, p. 336-342, 1988.

LUZ, Z. M. P.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L. L. V.; FIÚZA, V. O. P.; RABELLO, A. Urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 249-254, 2001.

MacMICKING, J.; XIE, Q-W.; NATHAN, C. F. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997

MAIA-ELKHOURY, A. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MAIOLI, T. U.; TANAKE, E.; ARANTES, R. M.; FIETTO, J. L.; AFONSO, L. C. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 207-212, 2004.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C.; TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, K. B. TRAMONTANO, N. C.; RANGEL FILHO, F. B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1, n.1, p. 5-17, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M. GRIMALD, Jr, MOMEN, H., et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 37-40, 1994.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994, Suplemento 2.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Ed.) **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 39-64.

MAURÍCIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, Pt. 4, p. 393-403, 2001.

MAYRINK, W. DA COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; LIMA, A. O.; et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 73, n. 4, p. 385-387, 1979.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.**, v. 79, n. 3, p. 259-269, 1985.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; TAFURI, W. L.; TOLEDO, V. P.; et al. Phase I and II Open Clinical Trials of a Vaccine Against *Leishmania chagasi* Infections in Dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 91, n. 6, p. 695-697, 1996.

MENDES, C. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G. P.; MELO BATISTA, L. M.; SANTOS, M. A.; PARRA, L. E.; et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine.**, v. , 21, n. 19-20, p. 2589-2597, 2003.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária.**, v. 23, p. 41-45, 2004. Suplemento 1.

MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 40, n.1, p. 42-48, 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology.**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 27, p. 67-72, 1994. Suplemento 3.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S.; et al. Risk factors *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology.**, v. 115, n. 7, p. 9-23, 1997.

NADIM, A.; JAVADIAN, E.; TAHVILDAR-BIDRUNI, G.; GHORBANI, M. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales.**, v. 76, n. 4, p. 377-383, 1983.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology.**, v. 11, n. 10, p. 1464-1488, 2011.

NICO, D.; CLASER, C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Cloning of the Nucleoside hydrolase of *Leishmania donovani* aiming at the development of a synthetic vaccine against visceral leishmaniasis. **Procedia in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 115-119, 2009.

NICO, D.; CLASER, C.; TRAVASSOS, L. R.; PALATNIK, M.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Adaptive immunity against *Leishmania* nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1-13, 2010.

NICO, D.; GOMES, D. C.; ALVES-SILVA, M. V.; FREITAS, E. O.; MORROT, A.; BAHIA, D.; et al. Cross-Protective Immunity to *Leishmania amazonensis* is Mediated by CD4+ and CD8+ Epitopes of *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase Terminal Domains. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 189, 2014.

NICO, D.; GOMES, D. C.; PALATNIK-DE-SOUSA, I.; MORROT, A.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 273, 2014.

NIETO, C. G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral response against total and recombinant anti-gens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E.; et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805-4810, 2005.

NYLÉN, S.; SACKS, D. L. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DUTRA, H. S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the Fucose Mannose Ligand (FML). **Acta Tropica**, v. 53, n. 1, p. 59-72, 1993.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; GOMES, E. M.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *L. donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 27, n. 2, p. 547-551, 1994.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v. 26, n. 14, p. 1709-1724, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., BARBOSA, A de F.; OLIVEIRA, S. M.; NICO, D.; BERNARDO, R. R.; SANTOS, W. R.; et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 6, p. 833-851, 2008.

PARRA, L. E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SOUZA, L. O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; MENZ, I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine.**, v. 25, n. 12, p. 2180-2186, 2007.

PEARSON, R. D. Pathology of leishmaniasis. In: KENNETH, S. WARREN (Ed). **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3tr ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 71-86.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Ensaio sobre vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública.**, v. 6, p. 141-147, 1941.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science.**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; EL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J.; Compensation for Decreased Expression of B7 Molecules on *Leishmania infantum*-Infected Canine Macrophages Results in Restoration of Parasite-Specific T-Cell Proliferation and Gamma Interferon Production. **Infection and Immunity.**, v. 67, n. 1, p. 237-243, 1999.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity.**, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; SHAW, M. A.; DAY, M. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C.; KAYE, P. M. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **The Journal Infectious Diseases.**, v. 183, n. 9, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J.; et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 91, n. 3-4, p. 161-168, 2003.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v.112, n. 3-4 p. 102-116, 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental**

Immunology., v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to Leishmania and rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology.**, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.

REY, Luís. Leishmania e Leishmaníases: os parasitos. In:_____. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 25, p. 359-371.

Rio de Janeiro (Estado). Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil. Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses. Superintendência de Vigilância e Fiscalização Sanitária em Zoonoses. Nota técnica n.º 01/2011/s/SUBVISA/SVFSZ. Orientações sobre vigilância, prevenção e controle da Leishmaniose Visceral (LV) em caninos, no município do Rio de Janeiro (MRJ), em virtude da confirmação de transmissão canina da doença, no bairro do Caju – Área Programática 1.0. 2011.

Rio de Janeiro (Estado). Prefeitura da Cidade do Rio De Janeiro. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Transmissíveis e Imunopreveníveis. Gerência de doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses. Nota técnica n.º 5/2012/GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SESRJ Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. 2012.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. Jr. Kinetoplast: Trypanosomes and Their Kin. In:_____. GERALD D. SCHMIDT & LARRY S. ROBERTS' **Foundations of Parasitology.** 8th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2009. p. 61-88.

ROCHA, F. J.; SCHLEICHER, U.; MATTENER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and Immunity.**, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B. S.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; et al. Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected and fli parasite survival. **PLoS Pathogens.**, v. 5, n. 8, e 1000555, 2009.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAHA, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, A.; GHOSE, J.; BHOWMICK, S.; ALI, N. Immune responses in kala-azar. **The Indian Journal Medical Research.**, v. 123, n. 3, p. 245-266, 2006.

SALOMÓN, O. D.; ORELLANO, P. W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 100, n. 5, p. 475-476, 2005.

SALOMÓN, O. D.; QUINTANA, M. G.; BRUNO, M. R.; QUIRICONI, R. V.; CABRAL, V. Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 5, p. 801-804, 2009.

SANTANA, D. M.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G. P.; STURM, N. R.; PALATNIK DE SOUSA, C. B.; CAMPBELL, D. A. Nucleoside Hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an Antigen Diagnostic for Visceral Leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, v. 120, n. 2, p. 315-319, 2001.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, 2002.

SARAIVA, E. M.; DE FIGUEIREDO BARBOSA, A.; SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; NICO, D.; SOUZA, L. O.; et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine.**, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, 2006.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. **Journal of Medical Entomology.**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.**, v. 57, n. 5, p. 435-438, 2015.

SILVA, A. R.; VIANA, G. M. C.; VARONIL, C.; PIRES, B.; NASCIMENTO, M. D. S. D.; COSTA, J. M. L. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 30, n. 5, p. 359-368, 1997.

Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genome Organization, Transcription, Replication and Evolution. **Annual Review of Microbiology.**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOUZA, L. O. P.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. The Nucleoside hydrolase DNA vaccine NH36 in prophylactic vaccination against mice tegumentar leishmaniasis. **Procedia in vaccinology.**, v. 1, n. 1, p. 120-123, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARE, J. E.; et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology.**, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

STEBUT, E.; METZ, M.; MILON, G.; KNOP, J.; MAURER, M. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF alpha. **Blood.**, v. 10, n. 1, p. 210-215, 2003.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 180, n. 3, p. 783-793, 1994.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, U. S.; Wu, C. Y.; SEDER, R. A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/ effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America.**, v. 97, n. 15, p. 8427-8432, 2000.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006.

ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GERBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology.**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VITORIANO-SOUZA, J.; REIS, A. B.; MOREIRA, N. D.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. **Vaccine.**, v. 26, n. 31, p. 3922-3931, 2008.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J. C.; NÜSSLER, A. K.; TSELENTIS, Y.; DA SILVA, O. A.; GENTILINI, M.; et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 40, n. 1, p. 253-256, 1996.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública.**, v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.

YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R. Immunodominance in major histocompatibility class-I restricted T lymphocyte responses., **Annual Review of Immunology.**, v. 17, p. 51-88, 1999.

YEWDELL, J. W.; HAERYFAR, S. M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. **Annual Review of Immunology.**, v. 23, p. 651-682, 2005

WHO. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010.

WHO. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2016.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 583-594, 2004

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Defesa Agropecuária
Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários

NOTA TÉCNICA Nº 038/2014/DFIP/SDA

Assunto: Suspensão da Licença de Fabricação e Comercialização do Produto Leishmune - Vacina Contra Leishmaniose Visceral Canina

A vacina contra leishmaniose visceral canina **LEISHMUNE**, de propriedade da empresa Zoetis Saúde Animal encontra-se com a licença de fabricação e comercialização suspensa, por determinação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, devido ao não cumprimento ao *Regulamento Técnico para Pesquisa, Desenvolvimento, Produção, Avaliação, Registro e Renovação de Licenças, Comercialização e Uso de Vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina, aprovado pela Instrução Normativa Interministerial nº 31/2007*.

A vacina em pauta não atendeu completamente os requisitos para estudos de fase 3, referente à avaliação da eficácia vacinal previstos no supra citado regulamento, conforme avaliações realizadas pelo MAPA e Ministério da Saúde.

Considerando as razões técnicas que levaram à suspensão da licença do produto, o MAPA recomenda a descontinuidade do seu uso nos esquemas de vacinação, ficando sob responsabilidade do médico veterinário, após avaliações clínicas e sorológicas, estabelecer a melhor estratégia de imunização dos cães, no caso de animais que já tenham sido vacinados com o produto ora suspenso.

O retorno da fabricação e comercialização dependerá da condução de novos estudos a serem realizados pela empresa.

Brasília, 11 de Novembro de 2014.


Marcos Vinícius de S. Leandro Junior
Diretor DFIP

ANEXO 2

Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA**L-045/2015**

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-044/2015), intitulado "Avaliação dos padrões celulares e imunológicos contra Leishmaniose Visceral e de cães naturalmente infectados com *L. infantum*", sob a responsabilidade de **PAULA MELLO DE LUCA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 01/10/2019 e inclui o uso total de:

Outro, cepa:

Cão - *Canis familiaris* – 80 animais – 40 animais machos - 40 animais fêmeas –
Acima de 4 meses - \geq 30kg

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

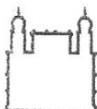
Rio de Janeiro, 21 de outubro de 2015.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4366 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1066

ANEXO 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-4/17

Certificamos que o protocolo (P-29/16-2), intitulado "AVALIAÇÃO DOS PADRÕES IMUNOLÓGICOS E CARGA PARASITÁRIA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*.", sob a responsabilidade de Fabiano Borges Figueiredo, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/12/2020 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 50 Machos.
- 50 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA