

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

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

MONIQUE PAIVA DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES IMUNOLÓGICOS DE CÃES IMUNIZADOS
CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Rio de Janeiro

2018

**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES IMUNOLÓGICOS DE CÃES IMUNIZADOS
CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL**

MONIQUE PAIVA DE CAMPOS

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz para obtenção do grau de Doutor em Ciências

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

Rio de janeiro

2018

MONIQUE PAIVA DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES IMUNOLÓGICOS DE CÃES IMUNIZADOS
CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao
curso de Pós-graduação em
Doenças Infecciosas do
Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas -
Ficoruz para obtenção do grau
de Doutor em Ciências

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

Aprovada em: 22/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fátima Conceição Silva (Presidente)
Instituto Oswaldo Cruz – IOC- Fiocruz

Dr. Flávio Fernando Batista Moutinho
Universidade Federal Fluminense – UFF

Dra. Fernanda Nazare Morgado
Instituto Oswaldo Cruz – IOC- Fiocruz

Dra. Fernanda Nunes Santos
Escola Nacional De Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP – Fiocruz

Dra. Marina Carvalho Furtado
Campus Fiocruz da Mata Atlântica – CFMA – Fiocruz

Dr. Sandro Antonio Pereira (suplente)
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI- Fiocruz

A Deus pela vida.
A minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, bênçãos e força com certeza sem Ele nada disso seria possível.

A minha mãe, Elma, que sempre foi meu exemplo de força e determinação, me ensinou a nunca desistir e fazer tudo com honestidade e dedicação.

Agradeço a minha família e amigos pelo apoio e força tanto nos bons e maus momentos, obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e alegrias nos momentos de união.

Agradeço ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo pela confiança, escolhas e dedicação. Obrigada por acreditar no meu sonho e sempre me apoiar.

A Dra. Paula Mello De Luca pela confiança, ensinamentos e orientação.

Agradeço a Alinne Renzetti e Sara Maria Marques de Souza pela amizade, dedicação, confiança e me apoiarem em todos os momentos! Esse trabalho é nosso.

Aos técnicos Artur Velho e Adilson da Silva, por me acompanharem em todas as coletas, pela amizade e pela prioridade.

Agradeço aos amigos, do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses (LAPCLIN-DERMZOO) que nunca me deixaram sozinha, me apoiando, chorando e sorrindo comigo. Vocês são minha segunda família.

Agradeço pela confiança e dedicação ao 1º batalhão de guardas do Exército e 1º batalhão de polícia do exército, especialmente a Capitã Renata Simões e soldados, ao tenente Alex Canto e todos os soldados que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Vigilância em Leishmaniose – INI/Fiocruz pela realização das culturas parasitológicas e a técnica Célia de Fátima M. Venâncio por toda assistência.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia – IOC/Fiocruz que proporcionou a realização de várias técnicas empregadas neste estudo. Aos alunos e funcionários que me apoiaram e me ensinaram muito.

Ao Laboratório de Imunodiagnóstico ENSP/ Fiocruz e ao Dr. Valmir Laurentino Silva pelo suporte.

A Biomanguinhos/Fiocruz, pelos kits diagnósticos e vacinas.

A plataforma de citometria de fluxo cell sorting/ IOC Fiocruz pela realização da técnica de citometria de fluxo e a técnica Thaize Quiroga pelo auxílio, conversas e ensinamentos.

A plataforma de Luminex/IOC Fiocruz pela realização da técnica de Luminex, principalmente ao técnico Edson Fernandes de Assis pela assistência e paciência.

A todos do Laboratório de Biologia celular e Mateus Nobrega Aoki ICC-Fiocruz, pelo acolhimento, carinho e confiança.

Ao Dr. Otávio de Melo Espíndola pela paciência e sempre me ajudar nas dúvidas e inseguranças.

A Faperj, CNPq e ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos os cães que fizeram parte do estudo, sem eles nada seria possível.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

(Francisco Cândido Xavier)

CAMPOS, M.P. **AVALIAÇÃO DOS PADRÕES IMUNOLÓGICOS DE CÃES IMUNIZADOS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL.** Rio de Janeiro, 2018. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz

RESUMO

No Brasil, a Leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum* e tem como seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, e o cão como reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico. Na tentativa de interromper o ciclo de transmissão e diminuir a prevalência da LV, são recomendados o recolhimento e a eutanásia dos cães infectados por *L. infantum*. No entanto, essa prática parece não estar sendo efetiva para a diminuição do número de casos e para a preservação de áreas não endêmicas, o que causa grande incômodo social. Autores sugerem que uma das medidas eficazes para o controle da leishmaniose visceral canina (LVC) seria o desenvolvimento de uma vacina efetiva. No Brasil, existem duas vacinas anti- LVC (Leishmune® e a Leish-Tec®). Porém, o Ministério da Saúde não recomenda o seu uso como forma de controle da LV, uma vez que os estudos de eficácia ainda são preliminares. O objetivo deste trabalho foi avaliar os padrões imunológicos de 28 cães imunizados com as vacinas Leish-Tec® ou Leishmune®, acompanhados durante um ano após o protocolo vacinal e comparar com a resposta de 18 cães naturalmente infectados. A avaliação de resposta humoral foi realizada por meio do estudo da soroconversão dos cães imunizados utilizando-se os testes DPP® LVC e ELISA LVC fornecidos pelo Ministério da Saúde, além da avaliação da indução de IgG total, IgG1 e IgG2 específicas para as proteínas indutoras de cada vacina FML (Leishmune®) e A2 (Leish Tec®) e ao extrato total de promastigota de *L. infantum* nos cães imunizados e naturalmente infectados. Por meio da técnica de citometria de fluxo foram avaliados os fenótipos de linfócitos T e linfócitos B *ex vivo*, no sangue periférico dos cães em diferentes tempos após a vacinação em comparação com cães naturalmente infectados. Foi avaliada também a produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico após estímulo com extrato total de promastigota de *L. infantum* pela técnica de Luminex®. Observamos que os cães vacinados, seja com Leishmune® ou Leish-Tec®, não soroconverteram com os testes do Ministério da Saúde, sugerindo que a metodologia com DPP- LVC e ELISA é sensível e específica, sendo capaz de discriminar os cães verdadeiramente positivos para LVC daqueles imunizados. O nível de reatividade no soro dos animais vacinados com Leishmune® ou Leish-Tec® frente ao FML e a proteína A2, respectivamente foram altos. Com relação a avaliação dos fenótipos celulares observamos que, os animais naturalmente infectados com sinais clínicos, apesar de possuírem um percentual mais elevado de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico, apresentam uma diminuição no fenótipo de células CD8⁺ ativadas (CD8⁺CD25⁺) quando comparados aos grupos imunizados. Quanto à produção de citocinas, foi observado que os cães imunizados ou naturalmente infectados produziram citocinas pró e anti-inflamatórias, mas que não se mantiveram por 12 meses. O padrão de resposta imunológica celular ou humoral foi semelhante nos cães vacinados com a Leishmune® ou Leish-Tec®, entretanto não há indícios suficientes, até o momento, para o uso das vacinas como controle da LV. Estudos com cães de áreas não endêmicas, com as vacinas estudadas e novas proteínas vacinais são fortemente recomendadas.

Palavras Chave: Saúde Pública, leishmaniose visceral canina, vacina, imunidade, diagnóstico.

CAMPOS, M. P. **EVALUATION OF THE IMMUNOLOGICAL PATTERNS OF DOGS IMMUNIZED AGAINST VISCERAL LEISHMANIOSIS**. Rio de Janeiro, 2018. Tesis [Science tesis in Clinic Research in Infectious Diseases] Evandro Chagas National Institute Of Infectious Diseases- Fiocruz.

ABSTRACT

In Brazil, Visceral Leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania infantum* and has *Lutzomyia longipalpis* its main vector, and the dog (*Canis familiaris*) as reservoir in the domestic and peridomestic environment. In the attempt of interrupting the cycle of transmission and reducing the predominance of VL it is recommended the retirement and the euthanasia of *Leishmania infantum* infected dogs. However, this practice seems not to be effective for the reduction in the numbers of cases and in the preservation of areas not endemic, leading to great social nuisance. Some authors suggest that one of the efficient measures for the control of the canine visceral leishmaniose (CVL) would be the development of an effective vaccine. In Brazil, there are at present two vaccines anti - CVL. The Leishmune® and the Leish-Tec® vaccines. In spite of any promising data, the Ministry of Health does not recommend its use as an control measumentagainst visceral leishmaniose, since the studies are still preliminary. The objective of the present work is to evaluated the immunological pattern of 28 dogs immunized with the vaccines Leish-Tec® or Leishmune®, during a one year followup, after the first application, in comparison with 18 naturally infected dogs. The evaluation of humoral response was performed through the seroconversion study of the immunized dogs using the DPP- LVC and ELISA tests provided by the Ministry of Health, in addition to the evaluation of IgG, IgG1 and IgG2 specific for FML and A2 proteins, as well to *L. infantum* promastigotes total extract , in immunized and naturally infected dogs. Through the flow cytometry technique, we evaluated the T lymphocyte and B lymphocyte phenotypes *ex vivo* in the peripheral blood of vaccinated dogs at different times after vaccination, compared to naturally infected dogs. It was alsoevaluated the production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells after stimulation with *L. infantum* promastigotes total extract by luminex. We observed that vaccinated dogs, either with Leishmune® or with Leish-Tec®, did not seroconvert to the Ministry of Health tests, indicating that the methodology with DPV LVC and ELISA, is sensitive and specific, being able to screen dogs truly positive for LVC from those immunized. The level of reactivity in the serum of animals vaccinated with Leishmune® or Leish-Tec®specific forFML and protein A2, respectively were high. Regarding the evaluation of the cellular phenotypes, we observed that naturally infected symptomatic animals, despite having a higher percentage of CD8⁺ T lymphocytes in the peripheral blood, presented a decrease in the activated CD8⁺ cell phenotype (CD8⁺ CD25⁺) when compared to the immunized groups. Regarding cytokines production , it was observed the production of pró and anti-inflammatory cytokines in immunized and naturally infected groups, , but cytokines were not maintained for 12 months after immunization. The pattern of cellular or humoral immune response was similar in dogs vaccinated with Leishmune® or Leish-Tec®, however there is insufficient evidence, to date, of the use of vaccines as a control of visceral leishmaniasis. New studies are required with dogs from non-endemic areas, with vaccines from this study and new vaccine proteins .

Key words: Public Health, canine visceral leishmaniasis, vaccine, immunity, diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos monoclonais (Serotec - Oxford, Inglaterra), utilizados para imunofenotípagem celular do PBMC canino.....	26
Tabela 2 – Características da população canina imunizadas com a Leishmune® e Leish-Tec® e naturalmente infectada por <i>L. infantum</i>	32
Tabela 3 - Comparação da resposta vacinal (IgG total) dos cães imunizados nos diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses após protocolo vacinal, T12-12 meses após protocolo vacinal e dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	40
Tabela 4 - Comparação da resposta vacinal (IgG1) dos cães imunizados nos diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses após protocolo vacinal, T12-12 meses após protocolo vacinal) e dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	40
Tabela 5 - Comparação da resposta vacinal (IgG2) dos cães imunizados nos diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses após protocolo vacinal, T12-12 meses após protocolo vacinal) e dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fluxograma 1 - Grupos de cães do estudo, tempo de acompanhamento dos cães vacinados e exames realizados no estudo.....20
- Figura 1: *Dual Path Platform* – DPP® LVC, teste imunocromatográfico para leishmaniose visceral canina.....22
- Figura 2: 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 controles, imunizados nos 3 tempos de estudo e naturalmente infectados.....28
- Figura 3: Índice de reatividade (níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2) de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® e no grupo de cães naturalmente infectados anti A2 e antígeno *L. infantum*.....36
- Figura 4: Índice de reatividade (níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2) de cães imunizados com a vacina Leishmune® e no grupo de cães naturalmente infectados anti – FML e antígeno *L. infantum*.....38
- Figura 5: Representação dos percentuais dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD4, CD8, CD25) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães imunizados com a Leish-Tec® (n=12) comparado com um grupo de cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), com sinais clínicos leve (n=4) e grave (n=13).....43
- Figura 6: Representação dos percentuais dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD4, CD8, CD25) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães imunizados com a Leishmune® (n=10) comparado com um grupo de cães positivos para Leishmaniose visceral canina (LVC), com sinais clínicos leve (n=4) e grave (n=13).....44
- Figura 7: Quantificação de citocinas produzidas em culturas de PBMCs, após estímulo com extrato total de promastigotas de *L. infantum*, pela metodologia de Luminex, em cães imunizados com a Leishmune® (n=5), Leish-Tec® (n=6) e cães naturalmente infectados com

doença leve (L) (n=4) e doença grave (G) (n=6).....	47
Quadro 1 - Comparação dos resultados dos testes realizados para controle de soroconversão (DPP LVC e ELISA) e padrão de referência (qPCR e cultura parasitológica) nos cães imunizados, nos animais naturalmente infectados.....	34
Quadro 2 - Médias de produção de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados contra leishmaniose visceral canina após estímulo com a Concanavalina A.....	45

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice 1 - Ficha clínica dos animais do estudo.....	84
Apêndice 2 - Artigo publicado pela revista Ciência Rural (ISSN 1678-4596).....	85
Anexo 1- Licença da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/IOC com o número L-45/2015.....	87
Anexo 2 - Licença da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/Fiocruz com o número LW-4/17.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – *antigen presenting cells* / Célula apresentadora de antígeno
- A2 – Proteína recombinante família A2
- BG – Batalhão de Guerra
- BPE – Batalhão de Policia do Exército
- BSA – *Bovine serum albumin*/ albumina bovina sérica
- CD – *Cluster of differentiation* / grupamento de diferenciação
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Co₂ – Dióxido de carbono
- DMSO – *Dimethyl sulfoxide* / Dimetil sulfoxido
- DPP® – *Dual-Path platform technology* / Tecnologia de dupla plataforma
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA/EIE- Ensaio imunoenzimático
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz.
- FML – *fucose-mannose ligante* / Ligante de fucose – manose
- gEq – Equivalente genômico
- IFN- γ – Interferon-gama
- IgA – Imunoglobulina A
- IgE – Imunoglobulina E
- IgG – Imunoglobulina G
- IL – Interleucina
- INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- kDNA – DNA do cinetoplasto
- Lapclin-Dermzoo - Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
- LiAg – Extrato total de promastigota de *Leishmania infantum*
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- LVA – Leishmaniose visceral americana
- LVC – Leishmaniose visceral canina

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL– Mililitro

MS- Ministério da Saúde

NNN – Meio de cultura Novy, Nicolle e McNeal

NH36 – Nucleosídeo Hidrolase 36

ng – Nanograma

PCR– *Polymerase chain reaction* / Reação em cadeia da polimerase

PBS – *phosphate buffered saline* / Salina fosfatada tamponada

PBMC – *peripheral blood mononuclear cell* / Células mononucleares do sangue periférico

qPCR – PCR quantitativa

QuilA – Adjuvante saponina

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute médium* / meio *Roswell Park Memorial Institute*

SFB – Soro Fetal Bovino

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

SPSS – *Statistical Package for the Social Science* / pacote estatístico para as ciências sociais

TNF – *Tumor Necrosis Factor* / Fator de necrose tumoral

Th – linfócito T auxiliar

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

WHO – World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

µm – Micrometro

µL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses	1
1.2 Leishmaniose visceral canina	2
1.2.1 <i>Imunidade na Leishmaniose visceral</i>	3
1.2.2 <i>Sinais clínicos na Leishmaniose visceral canina</i>	4
1.2.3 <i>Diagnóstico</i>	5
1.2.4 <i>Controle</i>	7
1.3 Vacinas	10
1.4 Vacina Leishmune®	11
1.5 Vacina Leish-Tec®	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Desenho do estudo	17
4.2 Populações do estudo	18
4.3 Obtenções das amostras de sangue e de medula óssea	21
4.4 Avaliação dos efeitos adversos	21
4.5. DPP - Dual Path Platform – DPP LVC	22
4.6 Ensaio Imunoenzimático diagnóstico (ELISA LVC)	22
4.7 Padrão de referência do estudo	23
4.7.1 <i>Isolamentos parasitários em meio de cultura</i>	23
4.7.2 <i>Realização da técnica de qPCR para diagnóstico da LVC</i>	23
4.8 Resposta imune humoral	24
4.8.1 <i>Deteção de anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2) específicos para as proteínas FML, A2 e extrato total de promastigotas de L. infantum por ELISA</i>	24
4.9 Resposta imune celular	25
4.9.1 <i>Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)</i>	25
4.9.2 <i>Descongelamento de células de sangue periférico para uso em citometria de fluxo</i>	26
4.9.3 <i>Imunofenotipagem celular ex vivo por citometria de fluxo</i>	26
4.9.4 <i>Extrato total de promastigotas de L. infantum (LiAg)</i>	28
4.9.5 <i>Quantificação de citocinas em culturas de PBMCs estimuladas com extrato total de promastigotas de L. infantum pelo método de Luminex</i>	29
4.10 Análise estatística	29
4.11 Aspectos éticos	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Características da população de estudo	31
5.2 Avaliação dos efeitos adversos	32
5.3 Resultados do padrão de referência e soroconversão	33
5.4 Resultados da detecção de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2) específicos para as proteínas FML, A2 e extrato total de promastigotas de L. infantum	34
5.4.1 <i>Níveis de anticorpos específicos (IgG, IgG1 E IgG2) para a proteína A2 e LiAg no soro de cães imunizados com a Leish-Tec® e cães naturalmente infectados</i>	35

5.4.2 níveis de anticorpos específicos (IgG, IgG1 E IgG2) para o FML e LiAg no soro de cães imunizados com a Leishmune® e cães naturalmente infectados.....	36
5.5 Resultados da imunofenotipagem celular	41
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICES	83
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são classificadas como zoonoses que acometem o ser humano e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, sob a forma de doenças infecciosas crônicas com diversas manifestações clínicas (GRIMALDI e TESH, 1993).

São consideradas doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as principais formas da doença são leishmaniose visceral, leishmaniose dérmica pós calazar, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. A leishmaniose visceral ganha destaque pela gravidade e pela alta mortalidade. Cerca de 200 países relataram casos de leishmanioses e 250 mil novos casos de leishmaniose visceral, em 2015 no mundo (WHO, 2017).

Nas Américas, podem ser classificadas como: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; 2017).

Casos de LTA já foram notificados em todo os estados Brasileiros, o padrão epidemiológico da doença esta relacionado com o contato com o ambiente silvestre, desmatamento e processo de migração e moradia em locais de encostas ou aglomerados urbanos próximos de matas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Na LVA os casos eram provenientes de áreas rurais e principalmente a região Nordeste, porém esse processo sofreu mudanças e a LVA sofreu urbanização ocorrendo em todas as regiões do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Inclusive na região Sul, que era considerada indene para LVA (SOUZA, et al. 2014; PINA TRENCH, et al. 2016, nota informativa governo do Rio Grande do Sul, 2017).

Os protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), são flagelados da Família *Trypanosomatidae*, Ordem *Kinetoplastida* (IMAM, 2009) e se caracterizam pela presença de mitocôndria incomum, o cinetoplasto, cujo material genético denominado kDNA é composto por maxicírculos e minicírculos (BREWSTER, 1998).

São parasitos intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados. A infecção dos vetores flebotomíneos ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas, ingerindo também macrófagos infectados com as formas amastigotas do parasito. No trato digestivo anterior destes insetos ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação dos parasitos, que sofrem rápida diferenciação para formas promastigotas, que se reproduzem por sucessivos processos de divisão binária (GONTIJO e MELO, 2004).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o novo repasto sanguíneo do vetor, onde as formas promastigotas presentes na glândula salivar deste são inoculadas na pele. Uma vez no tecido, estes parasitos são internalizados por fagócitos, e dentro do vacúolo parasitóforo se diferenciam em formas amastigotas (REY, 1991; CONCEIÇÃO-SILVA E ALVES, 2014).

As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LVA no Brasil são *Lutzomyia longipalpis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e *Lutzomyia cruzi* também foi descrita no estado do Mato Grosso do Sul exercendo esse papel (GALATI, et al. 1997; SANTOS, et al. 1998). Na LTA *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. Migonei* são as espécies transmissoras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Na LTA as formas amastigotas são geralmente encontradas nas lesões de pele e/ou mucosa, enquanto que na LVA as amastigotas migram da pele para outros órgãos, principalmente fígado, baço, medula óssea. Esse processo ocorre de maneira semelhante em humanos e animais, e o cão (*Canis familiaris*) pode desenvolver as duas formas de leishmaniose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; 2017).

1.2 Leishmaniose visceral canina

No Brasil, a LV é causada por *Leishmania infantum* (sin: *Leishmania (Leishmania) chagasi*,) (KUHLS, 2011) e tem como seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, o cão e canídeos silvestres atuam como reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico, ambos contribuindo para o ciclo de manutenção da doença (FRANÇA-SILVA, et al. 2005).

Outras possíveis formas de transmissão foram relatadas, como por exemplo, a transmissão venérea e vertical (SILVA, et al. 2009; BOECHAT, et al. 2016) e transfusão de sangue (OWENS, et al. 2001). Embora essas outras formas de transmissão não tenham papel epidemiológico comprovado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Novos casos de LVC são descritos em áreas consideradas indenes para a doença, como por exemplo em municípios do Rio de Janeiro (SILVA, et al. 2015), São Paulo (CARDIM, et al. 2016), Rio Grande do Sul (SOUZA, et al. 2014), Piauí (PEREZ et al. 2016).

1.2.1 Imunidade na *Leishmaniose visceral*

No hospedeiro imunocompetente, a resposta imune inata e adquirida estabelecem o grau de expressão da doença (FREITAS, et al. 2013). Na resposta imune inata contra a leishmania se inicia no local de inoculação, onde as formas promastigotas serão fagocitadas principalmente por macrófagos e células dendríticas, essa interação entre parasito e hospedeiro desencadeia respostas imunológicas com produção de citocinas e sinalização para células de defesa com o objetivo de eliminar a células parasitadas (FREITAS, et al. 2010).

Os neutrófilos são uma das primeiras células de defesa a entrar em contato com a *Leishmania*, servindo com célula hospedeira e efetora na tentativa de eliminar o parasito (LOPES, et al. 2014). O papel protetor ou prejudicial dos neutrófilos na leishmaniose ainda não foi esclarecido, uma vez que servem como agentes destruidores de patógenos e também auxiliam na infecção de macrófagos, que fagocitam neutrófilos infectados em apoptose favorecendo a infecção (RITTER, et al. 2009).

A resposta imune adquirida ou adaptativa é mediada por linfócitos. A resposta de células TCD4⁺ do tipo 1 (Th1) envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs) e liberação de citocinas pró-inflamatórias, o interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), prevenindo a manifestação da doença após um estado latente e o estabelecimento da fase crônica (REIS, et al. 2010). A resposta imunológica do cão pode controlar a carga parasitaria e conseqüentemente controlar os sinais clínicos (ABBEHUSEN, et al. 2017).

Ao longo do desenvolvimento da resposta imune na infecção por *Leishmania*, são produzidas também citocinas reguladoras, a IL-4, a IL-10 e a IL-13, que estão associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta Th1, inibindo a ativação de macrófagos, favorecendo assim a infecção (MURRAY, et al. 2002). A IL-10 tem sido relacionada com a progressão da LVC (BOGGIATTO, et al. 2010). Porém o padrão de citocinas da resposta Th2 ainda não foi bem estabelecida (BARBIERI, 2006; SANTOS GOMES, et al. 2002; CARRILO & MORENO, 2009).

Autores observaram que em cães com LV ocorre uma produção equilibrada de citocinas Th1 e Th2, mas a alta produção de IL-10 resulta no aumento da carga parasitária e progressão da doença (LAGE, et al. 2007).

Além da resposta Th1 e Th2, a resposta de linfócito Th17 e célula T reguladora (Treg) desempenham papel na indução e controle da resposta inflamatória (SRIVASTAVA, et al. 2016).

Quanto à resposta humoral, foi descrito que o aumento dos níveis de IgA e IgE podem estar associadas ao aumento dos sinais clínicos e progressão da LVC. Além disso, nos cães assintomáticos foram observados maiores níveis de IgG1 e nos sintomáticos, IgG2, IgA e IgE, que podem ser usados como marcadores de prognóstico da LVC (REIS, et al. 2006a). Porém essa dicotomia não está bem esclarecida, já que outros autores observaram maior nível de IgG1 em animais infectados e aumento de IgG2 em animais imunizados com a Leishmune® (MENDES, et al. 2003). Solano–Gallego e colaboradores (2001), relataram uma grande variação no nível de IgG1 em animais infectados sintomáticos e assintomáticos, entretanto a correlação com o IgG2 não foi possível. Nieto e colaboradores (1999) relataram altos níveis de IgG1 em em cães infectados experimentalmente com *L. infantum* com doença ativa. Essas diferenças entre os resultados dos estudos podem ser atribuídas ao uso de anticorpos policlonais, que podem ter reação cruzada inespecífica com outras subclasses de IgG (DAY, 2007).

Mecanismos de escape da *Leishmania* spp. influenciam no desenvolvimento da infecção e doença. Ao infectar a célula hospedeira a *Leishmania* spp é capaz de induzir a expressão de quimiocinas que podem recrutar células de defesa que serviriam para nova infecção, sobrevivência e proliferação do parasito. Além disso, algumas espécies podem diminuir a indução de citocinas pró-inflamatórias (OGHUMU, et al. 2010).

A resposta imunológica e a carga parasitária estão diretamente relacionadas com os sinais clínicos apresentados (REIS, et al. 2010; ABBEHUSEN, et al. 2017).

1.2.2 Alterações clínicas e laboratoriais na Leishmaniose visceral canina

No cão, a doença tem um curso lento e de caráter crônico e os sinais clínicos estão relacionados com a imunocompetência do animal (REIS, et al. 2006b), carga parasitária e localização do parasito (REIS, et al, 2006c). Cerca de 40% a 60% da população soropositiva pode não apresentar sinais clínicos, porém esse cães podem servir como fonte de infecção para o vetor (MARZOCHI e MARZOCHI, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os sinais clínicos mais observados são onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, rinorréia, apatia, diarreia e vômitos,

emagrecimento. Das alterações oftálmicas as principais são, uveíte, conjuntivite, blefarite, ceratite e ceratoconjuntivite seca (FIGUEIREDO, et al. 2010; CAMPOS, et al. 2013; FREITAS, et al. 2017; OLIVEIRA, et al. 2017).

L. infantum pode estar distribuída por vários órgãos por isso a LVC geralmente apresenta sinais clínicos generalizados, tais como anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (FREITAS, et al. 2017). A doença renal é uma das manifestações clínicas da LVC e também um fator de progressão grave nos cães podendo ser fatal (SOLANO-GALLEGO et al. 2011).

1.2.3 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico das leishmanioses deve considerar a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, uma vez que a doença produz um amplo espectro de manifestações clínicas, o que torna o diagnóstico difícil (GONTIJO e MELO, 2004).

Os métodos de diagnóstico parasitológico incluem: identificação microscópica direta e isolamento do parasito em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos (GONTIJO e MELO, 2004). Em áreas endêmicas de LVC, os testes sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães positivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico dos cães suspeitos de LVC podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e, em alguns casos, de fragmentos de pele íntegra, lesão ou vísceras (REIS, et al. 2006c; FURTADO, et al. 2015).

No exame parasitológico direto, a pesquisa de formas amastigotas é realizada em lâminas de impressão por aposição do material coletado na punção, após coloração pela técnica de Giemsa, Leishman ou Panótico rápido. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios apropriados, sendo comumente utilizado o meio Novy, MacNeal e Nicolle (NNN) acrescido do meio Schneider e suplementado com 10% de soro fetal bovino (MADEIRA, et al. 2009a). Dada à especificidade de 100% e relativa sensibilidade, a cultura é considerada o padrão de referência para o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; CHOUHI, et al. 2009).

Por sua vez, a análise histopatológica dos fragmentos de tecido coletados por biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico das leishmanioses, pois permite a

identificação direta das formas amastigotas e, concomitantemente, contribui para o diagnóstico diferencial (TAFURI, et al. 2004).

Considerando os testes sorológicos, a detecção de resposta imune humoral pode ser realizada pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) (FIGUEIREDO, et al. 2010), sendo esta técnica mais comumente utilizada em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LVC e LVA, devido à facilidade da obtenção de amostras e aos baixos custos (NUNES, et al. 2001; ALMEIDA, et al. 2005; ARRUDA, et al. 2016). Porém, uma limitação dos testes sorológicos é a especificidade de baixa a moderada (ARRUDA, et al. 2016) em decorrência de possíveis reações cruzadas com *L. (Viannia) braziliensis* e outros tripanosomatídeos como, *Trypanosoma cruzi* (TRONCARELLI, et al. 2009) e *Trypanosoma caninum* (MADEIRA, et al. 2009b), que apresentam uma relação filogenética muito estreita com *L. infantum*, podendo resultar em falso-positivos nos testes sorológicos. Por outro lado, resultados falso-negativos podem ocorrer por atraso no período pré-patente ou pelo fato de alguns cães nunca soroconverterem (PARANHOS-SILVA, et al. 1996).

Desde 2011, o Ministério da Saúde recomenda o teste imunocromatográfico rápido DPP® (Dual Path Platform - BioManguinhos®/FIOCRUZ) como exame de referência na triagem da LVC. Contudo, resultados positivos no DPP- LVC® devem ser confirmados por ELISA (NOTA TÉCNICA N° 01/2011) para posterior eutanásia dos cães positivos para LV. O DPP LVC e ELISA como métodos sorológicos de diagnósticos se mostraram capazes de diferenciar cães infectados de cães saudáveis e vacinados (CAMPOS, et al. 2017a).

De modo geral, a baixa sensibilidade do exame microscópico direto de aspirados de medula óssea, a ineficiência de testes sorológicos na diferenciação de casos ativos e de cura, e o fato do isolamento de *Leishmania* spp em cultura ser um método trabalhoso e com baixa sensibilidade, compõem um panorama adverso ao diagnóstico laboratorial da LVC que, segundo alguns autores, pode ser superado com a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PIARROUX, et al. 1993; HU, et al. 2000).

As técnicas baseadas na PCR apresentam alta especificidade e sensibilidade, e a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pequena quantidade de material genético (MESQUITA, et al. 2001), podendo ser capaz de detectar até mesmo uma cópia da sequência-alvo de DNA (FURLANETO, et al. 2007).

Tem sido demonstrado que métodos moleculares baseados na PCR são importantes ferramentas para o diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, dentre elas as leishmanioses

(HARRIS, et al. 1998). Na detecção do DNA de *Leishmania* spp este método apresenta a vantagem de utilização de uma extensa variedade de amostras clínicas, como por exemplo, aspirados de linfonodos (REALE, et al. 1999; MANNA, et al. 2004), sangue (REITHINGER, et al. 2000; MANNA, et al. 2004), medula óssea (REITHINGER, et al. 2000), pele (ROURA, et al. 1999), “swab” oral e conjuntival (LOMBARDO, 2012), e pelos (BELINCHÓN-LORENZZO, 2012).

Por ser uma técnica baseada na detecção de DNA do agente infeccioso, a condição imunológica do animal não interfere no resultado do teste, podendo ser utilizado por isso em casos com resultado inconclusivo por outras técnicas, ou ainda nos casos de anergia ou de reação cruzada em testes sorológicos (ASHFORD, et al. 1995; LACHAUD, et al. 2002; MOREIRA, et al. 2007). No entanto, o custo elevado em comparação com testes sorológicos limita a sua utilização em larga escala como teste de triagem (GONTIJO E MELO, 2004).

1.2.4 Controle

Como controle da Leishmaniose visceral, o Ministério da Saúde recomenda que os casos humanos sejam diagnosticados e tratados precocemente, diminuição da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios domésticos e atividades de educação e saúde. E ressalta que devidos as características e complexidade da doença as medidas de controle ainda são pouco efetivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O cão tem sido considerado o principal reservatório e fonte de infecção para o vetor na área urbana. Por isso, como medida de controle, o Ministério da Saúde preconiza o não tratamento e a eutanásia de cães com diagnóstico positivo nos testes recomendados para LV (WHO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Além disso, tem sido descrito que a enzootia canina precede a ocorrência de casos em humanos, e que a prevalência de infecção é maior em cães que em humanos (DEANE & DEANE, 1955; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994B; PARANHOS-SILVA, et al. 1996; GALIMBERTTI, et al. 1999; PALATNIK-DE-SOUZA, et al. 2001). No entanto, a eutanásia de cães isoladamente não esta sendo uma medida efetiva para controle da LV no Brasil, devido a substituição de novos cães nas áreas endêmicas, o tempo entre um resultado positivo para LVC e a remoção do cão da área, necessidade de agentes constantes e treinados para o serviço (WERNECK, 2014). Neste contexto, políticas públicas de controle deveriam ser revistas (VON ZUBEN E DONALÍSIO, 2016).

O tratamento por outro lado é tóxico, caro e pouco eficaz, já que recidivas da doença podem ocorrer. Além disso, o tratamento fármacos usadas no tratamento humano não é indicado pelo risco de indução de resistência parasitária (WHO, 2010; ROATT, et al. 2014).

Protocolos terapêuticos têm sido testados, utilizando como, por exemplo, o antimoniato de meglunima, alopurinol, anfotericina B e imunoterápicos isoladamente ou em associação. E o que se observa é o desenvolvimento de uma resposta imunológica com redução dos sinais clínicos e diminuição da carga parasitaria, mas a cura parasitaria não foi descrita (MANNA, et al. 2009; ROATT, et al. 2014, YASUR-LANDAU, et al. 2016).

Em um estudo conduzido no Brasil utilizando a miltefosina no tratamento de cães com LVC, foi observada a melhora clínica dos cães, redução da carga parasitária e redução da transmissibilidade para flebotomíneos (NOGUEIRA & LISBOA, 2017). Em 2016 o MAPA e o MS em nota conjunta autorizaram o registro do medicamento Milteforan® (VIRBAC SAUDE ANIMAL), a base de miltefosina, para o tratamento da LVC, mas ressalta que este fármaco não é utilizado no tratamento da LV humana, pois não há evidências científicas de eficácia para incorpora-lá no protocolo de tratamento (NOTA TÉCNICA MS 11/2016). Em 2017, o medicamento foi lançado no Brasil e este pode ser utilizado como medida de tratamento individual em cães e não como controle da LV (NOTA TÉCNICA MS 11/2016).

A imunoterapia é uma prática que vem sendo discutida ha algum tempo. Cabrera e colaboradores (2004) observaram que a vacina de FML e saponina (QuilA) (Leishmune®) foi efetiva no tratamento de cães assintomáticos infectados experimentalmente levando ao aumento de linfócitos TCD8 *ex vivo* após tratamento com a vacina. Utilizando a NH36 como imunógeno (o componente proteico do FML, presente na Leishmune®), foi relatado a diminuição da carga parasitária e da perda de peso e o aumento da sobrevida dos cães tratados (BORJA-CABRERA, et al. 2012).

Outras medidas de controle podem ser implementadas, como por exemplo o uso de coleiras repelentes impregnadas com deltametrina, e repelentes top spot com permetrina. Ferroglio e colaboradores (2008) observaram uma diminuição de 84% do risco de infecção em cães de uma área endêmica da Itália, utilizando permetrina em top Spot e a coleira Scalibor® (MSD® saúde animal). No Brasil, em Minas Gerais, foi observado uma redução de 50% na razão de chance na taxa de soroconversão para *Leishmania* spp, utilizando a Scalibor® (MSD® saúde animal) (REITHINGER, et al. 2004).

Dye (1996) em um modelo matemático, sugere que o controle de flebotomíneos seria eficiente para o controle da LV. No controle dos vetores pode ser utilizado o controle químico, por meio de borrifadas de inseticidas, e também o manejo ambiental, como por exemplo, a retirada da matéria orgânica úmida, poda de árvores para aumentar a presença de sol e retirada e descarte adequado de matéria sólida. Por meio dessas medidas pode ocorrer a diminuição da densidade vetorial (LARA-SILVA, et al. 2017).

Porém, em uma avaliação do efeito do uso de inseticida e retirada de cães de uma área endêmica na diminuição da incidência da LV, foi observada significância estatística baixa a moderada na retirada de cães e sem diferença estatística no uso de inseticidas (WERNECK, et al. 2014). Além disso, o uso de inseticidas pode ser complexo, uma vez que pode ser pouco eficaz e gerar resistência (COSTA, et al. 2007).

Autores sugerem que as leishmanioses podem ser prevenidas pela vacinação (DYE, 1996; CHAPPUIS, et al. 2007; PALATNICK- DE –SOUZA, 2008). Para tal, a vacina contra leishmaniose deve ter como principais características a segurança, eficácia e manutenção da resposta imune, além de ser eficiente para diferentes espécies de *Leishmania*. Porém, por se tratar de um parasito intracelular, desenvolver uma vacina é um desafio, já que requer uma indução da resposta imune mediada por células específicas, necessitando de adjuvantes ou de sistemas de expressão, para aumentar a imunogenicidade e conseqüentemente a resposta protetora (DE LUCA, 2014).

No Brasil, duas vacinas anti-LVC foram licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas somente uma está disponível para comercialização atualmente. Apesar de alguns resultados promissores, o Ministério da Saúde publicou, no ano de 2009, uma nota esclarecendo sobre as vacinas anti-LVC, na qual não recomenda o seu uso como medida de controle da LV, uma vez que os estudos de eficácia ainda seriam preliminares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, NOTA DE ESCLARECIMENTO, 2009). Além disso, animais vacinados poderiam se tornar positivos nos exames sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde (SOLCÀ, et al. 2015; MARCONDES, et al. 2013).

1.3 Vacinas

Desde 1796 com Jenner, a imunização é utilizada como forma de prevenção de doenças (JAURIGUE & SEEBERGER, 2017). Várias doenças podem ser controladas com a vacinação, como por exemplo, tuberculose, hepatite B, febre amarela, raiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Neste sentido, diversos grupos de pesquisa tentam o desenvolvimento de uma vacina contra leishmanioses (PALATNIK-DE SOUZA, et al. 1994; CABRERA, et al. 2002; FERNANDES, et al. 2008; RESENDE, et al. 2016).

A primeira geração de vacinas contra Leishmaniose iniciou com inoculação de parasitos vivos (provenientes de lesões ativas ou cultura) em indivíduos saudáveis para provocar lesão, que com a cicatrização conferiria proteção contra a leishmaniose tegumentar, pratica conhecida como leishmanização. Porém essa prática foi sendo abandonada devido ao risco de resistência ao tratamento, perda de virulência, questões éticas, entre outras razões (KEDZIERSKI, 2011; DE LUCA, 2014).

O próximo passo foi a utilização de vacinas com o parasito morto. No Brasil os resultados foram promissores, chegando à eficácia de 80% no estudo de Pessoa & Pestana (1940) (APUD DE LUCA 2014). Mayrink e colaboradores (1979) observaram em estudo a campo em Minas Gerais, proteção parcial contra leishmaniose tegumentar em um grupo de pessoas imunizadas com um *pool* de promastigotas mortas de cinco diferentes cepas de *Leishmania*. Porém os resultados foram divergentes em outros lugares do mundo, mostrando segurança, mas baixa eficácia (HANDMAN, 2001; NAGILL & KAUR, 2011).

Vacinas atenuadas são consideradas uma boa alternativa contra leishmaniose. Neste tipo de vacina o parasito não está morto, mas a capacidade de infectar está diminuída devido a passagens sucessivas em meio de cultura ou animais, irradiação, seleção de drogas entre outros (MITCHELL, et al. 1984; RIVIER, et al. 1993; NAGILL & KAUR, 2011).

Vacinas de segunda geração utilizam peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes (NAGILL & KAUR, 2011). Diferentes proteínas foram identificadas e isoladas de leishmanias, das quais podemos destacar a glicoproteína gp63 (RIVIER, et al. 1999), FML (PALATNIK-DE SOUZA, et al. 1994), A2 (FERNANDES, et al. 2008) entre outras (NAGILL & KAUR, 2011)

Para expressão de antígenos vacinais, vírus ou bactérias recombinantes podem ser utilizados como vetores (HANDMAN, 2001). As vantagens desse tipo de imunização é que

micro-organismos vivos podem induzir melhor resposta imune, entretanto, agrupar as características necessárias para um bom vetor é extremamente difícil (DE LUCA, 2014).

A terceira geração de vacinas utiliza DNA (plasmídeo ou de vírus) contendo um gene, com o objetivo de codificar a proteína de interesse. Junto a esse DNA é acoplado o antígeno vacinal, tornando esse tipo de vacina, estável e imunogênica (NAGILL & KAUR, 2011; SHAHBAZI, et al. 2015). Porém, podem ocorrer reações adversas e o risco de partículas virais induzirem toxicidade (GLENTING & WESSELS, 2005).

Vacinas com saliva de flebotomíneos estão sendo testadas (BELKAID, et al. 1998; GIUNCHETTI, et al. 2008; RESENDE, et al. 2016). Estudos demonstraram que antígenos brutos de promastigota de *Leishmania braziliensis* e saponina associado com saliva de flebotomíneo, induziram a produção de citocinas do tipo Th1, consideradas protetoras, e diminuição de IL-4 e TGF- β (Th2) após o desafio experimental (RESENDE, et al. 2016), aumento de células CD21⁺, TCD4⁺, TCD8⁺ e óxido nítrico (GIUNCHETTI, et al. 2008; AGUIAR SOARES, et al. 2014). Além do aumento de IgG total, IgG1 e IgG2 e diminuição da carga parasitária em baço de cães (AGUIAR SOARES, et al. 2014), podendo esta vacina ser uma opção contra a LVC.

Mesmo com os avanços tecnológicos e a descoberta de novos antígenos o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose ainda é um desafio, pelos aspectos inerentes aos parasito, hospedeiros e dificuldade na condução dos estudos, tais como alto custo na investigação, número e tempo de cães acompanhados após a imunização (GRADONI, 2015).

1.4 Vacina Leishmune®

A vacina Leishmune® (Zoetis® Brasil), desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, é uma vacina inativada, composta pelo complexo de antígenos glicoproteico ligante de fucose e manose (FML) de promastigotas de *Leishmania donovani*, tendo como adjuvante a saponina (QuilA). O FML está presente em promastigotas e amastigotas e interfere, *in vitro*, na interação do parasito com macrófagos (PALATNIK-DE SOUZA, et al. 1994).

O principal componente do FML é o antígeno nucleosídeo hidrolase, uma glicoproteína com 36kD, por isso denominada NH36. Esta proteína é essencial para o

processo de replicação do DNA e está presente na superfície de promastigotas e amastigotas. Foi demonstrado que a imunização com a NH36 de *L. donovani* induz uma resposta protetora, principalmente pela ativação de linfócitos TCD4, contra infecção de *L. chagasi* em camundongos, inibindo a infecção de macrófagos murinos por promastigotas e amastigotas (PALATNIK DE SOUZA, et al. 1996; NICO, et al. 2014).

A saponina é o adjuvante utilizado na vacina Leishmune®, não demonstrou efeitos tóxicos nem inespecíficos em estudos prévios e demonstrou ser um bom potencializador da imunidade anti protozoários (PALATNIK DE SOUZA, et al. 1996).

Em 1994, Palatnik de Souza e colaboradores relataram a diminuição da carga parasitária no fígado, aumento da proliferação de esplenócitos e anticorpos em camundongos BALB/C desafiados com *L. donovani*. Em camundongos suíço albino, também foram observados diminuição da carga parasitaria e altos títulos de anticorpos (SANTOS, et al. 1999).

Em um estudo a campo com cães de área endêmica para LVC, foi observado que a proteção chegou a 95% cães, com eficácia vacinal de 80% após a imunização. Esses cães foram acompanhados por cerca de 3,5 anos após a vacinação (BORJA-CABRERA, et al. 2002).

A Leishmune® foi a primeira vacina contra LVC a obter licença para ser comercializada no ano de 2003. De acordo com os fabricantes, possui de 92-95% de proteção em cães e de 76-80% eficácia a campo (BORJA-CABRERA, et al. 2008) e com um efeito protetor significativo, de longa duração e forte contra a LVC (DA SILVA, et. al., 2001). Além disso, com potencial de ser uma vacina que bloqueia a transmissão para o flebotomíneo (SARAIVA, et al. 2006).

Desde 2014, a Leishmune® está com a comercialização temporariamente suspensa pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pois a vacina não atingiu completamente os requisitos dos estudos de fase III para avaliação da eficácia vacinal (MAPA, NOTA TÉCNICA 038/2014).

1.5 Vacina Leish-Tec®

A Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal), desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais, baseia-se na imunização do cão com uma proteína

recombinante de superfície de amastigota denominada A2, foi isolada anteriormente de *Leishmania pifanoi* (TRAUB-CSEKO, et al. 1993) mas está presente em várias espécies de *Leishmania* spp e envolvida com a indução de uma potente resposta do tipo 1, protetora contra LVC (RESENDE, et al. 2008). Porém, não foi encontrada em espécies do complexo *L. tropica* (*L. major*) e *L. braziliensis* (GHEDIN, et al. 1997). Por outro lado, Carvalho e colaboradores (2002) foram capazes de detectar através do ELISA anticorpos anti-A2 em pacientes humanos com leishmaniose mucosa e cutânea.

A proteína A2 possui cerca de 45 a 100 kDa. Foi descrita e caracterizada por Charest e Matlashewski (1994), sendo expressa em altos níveis na fase amastigota de *L. donovani*, mas não na fase promastigota, é considerada altamente imunogênica. Essas características são importantes fatores que justificam seu uso como antígeno em um teste diagnóstico e vacinas (GHEDIN, et al 1997). Além disso, a proteína A2 é considerada um importante fator para sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero, aumentando a sobrevivência dos macrófagos infectados nas vísceras (ZHANG, et al. 2003; NAGILL & KAUR, 2011).

A saponina também é usada como adjuvante na vacina Leish-Tec® e, assim como em outras vacinas, demonstrou estar envolvida na indução de resposta imune celular do tipo 1 em modelos experimentais (FERNANDES, et al 2008).

Ghosh e colaboradores (2002) observaram efeito protetor após a imunização de camundongos com a proteína recombinante A2 e desafiados com *L. donovani*, associado com a proliferação celular *in vitro*, produção de IFN- γ e resposta humoral anti-A2, concluindo que a A2 poderia proteger contra a infecção de *L. donovani* e leishmaniose visceral. Resende e colaboradores (2008), também observaram proteção em camundongos imunizados com a A2 e desafiados com *L. infantum*, demonstrando altos níveis de células TCD4 e TCD8 produtoras de IFN- γ , mas com baixa produção de anticorpos anti-A2 e que a célula TCD8 específica para A2 reduziram a carga parasitária do baço e fígado desses camundongos.

Fernandes e colaboradores (2008) relataram em trabalho experimental com cães e desafio com *L. infantum*, a proteção parcial dos cães associada a um aumento na produção de IFN- γ e diminuição de IL-10.

Foi licenciada pelo MAPA em 2008 com resultados promissores em relação a sua efetividade vacinal. Em estudos, 96% dos cães vacinados com Leish-Tec® permaneceram não infectados, resultando em eficácia vacinal de 71% (FERNANDES, et al. 2008). Fernandes e colaboradores (2014) relataram que 92,8% dos cães imunizados com a Leish-Tec®, em área

endêmica permaneceram saudáveis por até 11 meses. Em 2016, em estudo randomizado a campo com cães de uma área endêmica para LVC, foi observado cerca de 71,4% de eficácia vacinal (REGINA-SILVA, et al. 2016). Mas em 2017, Grimaldi e colaboradores em um estudo de eficácia em uma área endêmica para leishmaniose, observaram que mesmo vacinados, 43% dos cães desenvolveram a doença ao longo do acompanhamento (até 24 meses).

No momento é a única vacina contra LVC disponível comercialmente no Brasil.

2 JUSTIFICATIVA

A LV é uma importante zoonose que atualmente encontra-se em expansão. Na tentativa de interromper o ciclo de transmissão e diminuir a prevalência da LVC, são recomendados o recolhimento e a eutanásia dos cães infectados por *L. infantum*. No entanto, essa prática isoladamente parece não estar sendo efetiva para a diminuição do número de casos e para a preservação de áreas não endêmicas (SILVA, et al. 2015), causando incômodo social e aumento de críticas por parte de médicos veterinários, tutores e das sociedades protetoras de animais frente a esta prática. Protocolos terapêuticos também têm sido testados, entretanto, a cura parasitológica dos animais infectados ainda não foi comprovada (ROATT et al. 2014). Por este motivo, alguns autores sugerem que uma das medidas eficazes para o controle da LVC seria a vacinação (PALATNICK-DE-SOUZA, 2008).

Além disso, o cão é um dos melhores modelos experimentais para vacina em humanos, já que apresenta sinais clínicos semelhante e pode ser utilizado como triagem para a escolha de epítomos e antígenos promissores para vacinas (GARG & DUBE, 2006)

Duas vacinas anti *Leishmania* têm registro no MAPA para uso em cães, cujos estudos de avaliação da resposta imune e eficácia foram conduzidos pelos próprios grupos que as desenvolveram. Entretanto uma delas está temporariamente suspensa. Devido a isso, é importante uma avaliação por pesquisadores independentes, para que ambas as vacinas tenham seus efeitos comparados *in vitro e in vivo* por grupos de pesquisa que não estejam envolvidos diretamente com o seu desenvolvimento/fabricação/comercialização, evitando assim, o conflito de interesse.

O uso das vacinas ainda causa polêmica na saúde pública. Enquanto a vacina é liberada pelo MAPA para o uso individual em cães, o MS não recomenda seu uso coletivo como forma de controle, devido a estudos preliminares e a possíveis casos de falso positivos em inquéritos soroepidemiológicos.

Devido ao difícil controle da LVC torna-se importante que os padrões imunológicos de animais não vacinados, imunizados e naturalmente infectados sejam avaliados, para que possamos compreender melhor a resposta imune específica ao parasito, desencadeada no cão frente à vacina e a infecção natural pela *L. infantum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os padrões imunológicos de cães imunizados com as vacinas Leish-Tec® e Leishmune®, acompanhados durante um ano após o término do protocolo vacinal, em comparação com a resposta imune de animais naturalmente infectados.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os possíveis efeitos adversos clínicos após a administração das doses das vacinas;
- Avaliar a soroconversão em cães vacinados, por meio do teste imunocromatográfico (DPP- LVC) e do ensaio imunoenzimático (ELISA-LVC) pelo critério sorológico utilizado para o diagnóstico da LVC preconizado pelo Ministério da Saúde;
- Avaliar a resposta imune humoral específica (IgG total, IgG1 e IgG2) para os antígenos vacinais (FML e A2) e ao extrato total de promastigotas de *L. infantum* nos cães imunizados e naturalmente infectados;
- Identificar o fenótipo de linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺) e linfócito T ativado (CD25⁺) do sangue periférico de cães vacinados e cães naturalmente infectados;
- Avaliar a síntese de citocinas após estimulação das células mononucleares de sangue periférico de cães imunizados ou naturalmente infectados com extrato total de *L. infantum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de coorte no qual 28 cães do canil do Exército Brasileiro (1º Batalhão de Guardas (BG) e do 1º Batalhão de Polícia do Exército (BPE) foram submetidos à coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico e em diferentes períodos após a vacinação contra LVC para avaliação dos padrões imunológicos. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados dos mesmos testes, obtidos de um grupo de 18 cães naturalmente infectados.

Os cães do Exército Brasileiro são animais de raça definida (Pastor Alemão, Pastor Molinois, Pastor Belga, Labrador Retriever, Rottweiler e American Staffordshire), com histórico conhecido e alto valor genético. Vivem em canis individuais e com alimentação balanceada com ração comercial de boa qualidade, vacinados contra as principais infecções canina (Décupla -Vanguard® - Zoetis®, Tosse dos canis - BronchiGuard® - Zoetis® e Raiva -Rabisin I® - Merial® ou Defensor® - Zoetis®) e vermifugados regularmente (praziquantel, pirantel e febantel). Estes cães treinam fisicamente todos os dias para suas funções dentro do Exército (patrulhamento, policiamento de pessoal, guarda de instalações militares, detectores de entorpecentes e explosivos e o emprego em operações de garantia da lei e da ordem). Os dois canis estão localizados em áreas não endêmica para LVC na cidade do Rio de Janeiro (São Cristóvão e Tijuca).

Os cães de área endêmica, provenientes de Barra Mansa, em sua maioria sem raça definida, vivem domiciliados ou semi domiciliados juntamente com seus tutores. Estes cães passaram por testes (DPP-LVC e ELISA – LVC) devido a suspeita de LVC e foram positivos. Após o resultado foram encaminhados com o consentimento dos seus tutores ao Laboratório de Pesquisas Clínica em Dermatozoonoses- INI/Fiocruz (LAPCLIN-DERMZOO) para eutanásia e coleta de amostras.

Todos os cães do estudo foram amordaçados, contidos fisicamente, sedados e examinados clinicamente e as informações anotadas em uma ficha individual para cada cão (Apêndice 1).

4.2 Populações do estudo

- GRUPO CONTROLE:

Os cães do grupo controle (sadios) são aqueles que pertencem ao canil do Exército que foram imunizados, mas as amostras coletadas antes da vacinação (T0). Após a avaliação clínica e sedação, foram submetidos à coleta de amostras clínicas (sangue e medula óssea) para a realização dos exames no Tempo 0 (antes da imunização). Estas amostras serviram como grupo controle (T0) na análise dos dados.

- GRUPO DE CÃES IMUNIZADOS:

Os cães de cada canil foram selecionados e imunizados. Doze cães do canil BPE receberam a vacina Leishmune® (Zoetis, Nova Jersey, EUA) – lote: 004/14) e 16 cães do canil BG foram imunizados com a vacina Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil – lote 034/14) respeitando o protocolo vacinal indicado pelos fabricantes (três doses num intervalo de 21 dias).

Somente os animais que apresentaram resultado negativo para LVC no teste sorológico DPP LVC e nos testes do padrão de referência (PCR quantitativo (qPCR) e cultura parasitológica) foram incluídos no estudo e imunizados. Caso algum animal fosse considerado positivo para LVC seria encaminhado para eutanásia, conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil.

Critérios de inclusão: Cães sadios de ambos os sexos, cães com exame negativo para LVC, cães com idade superior a quatro meses.

Critério de exclusão: Fêmeas gestantes, cães imunocomprometidos por medicamento ou doença de base, cães positivos para leishmaniose, cães imunizados previamente com vacinas anti *Leishmania*, cães com amostras biológicas insuficientes para as análises.

Esses cães foram acompanhados durante um ano após a vacinação, com coleta de amostras biológicas em diferentes tempos para posterior realização dos exames.

Tempo 0: Exames clínicos, coleta das amostras (sangue venoso e medula óssea).

Tempo 1: (1 mês após término do protocolo vacinal): Exames clínicos, coleta de sangue venoso.

Tempo 6: (6 meses após término do protocolo vacinal): Exames clínicos, coleta de sangue venoso.

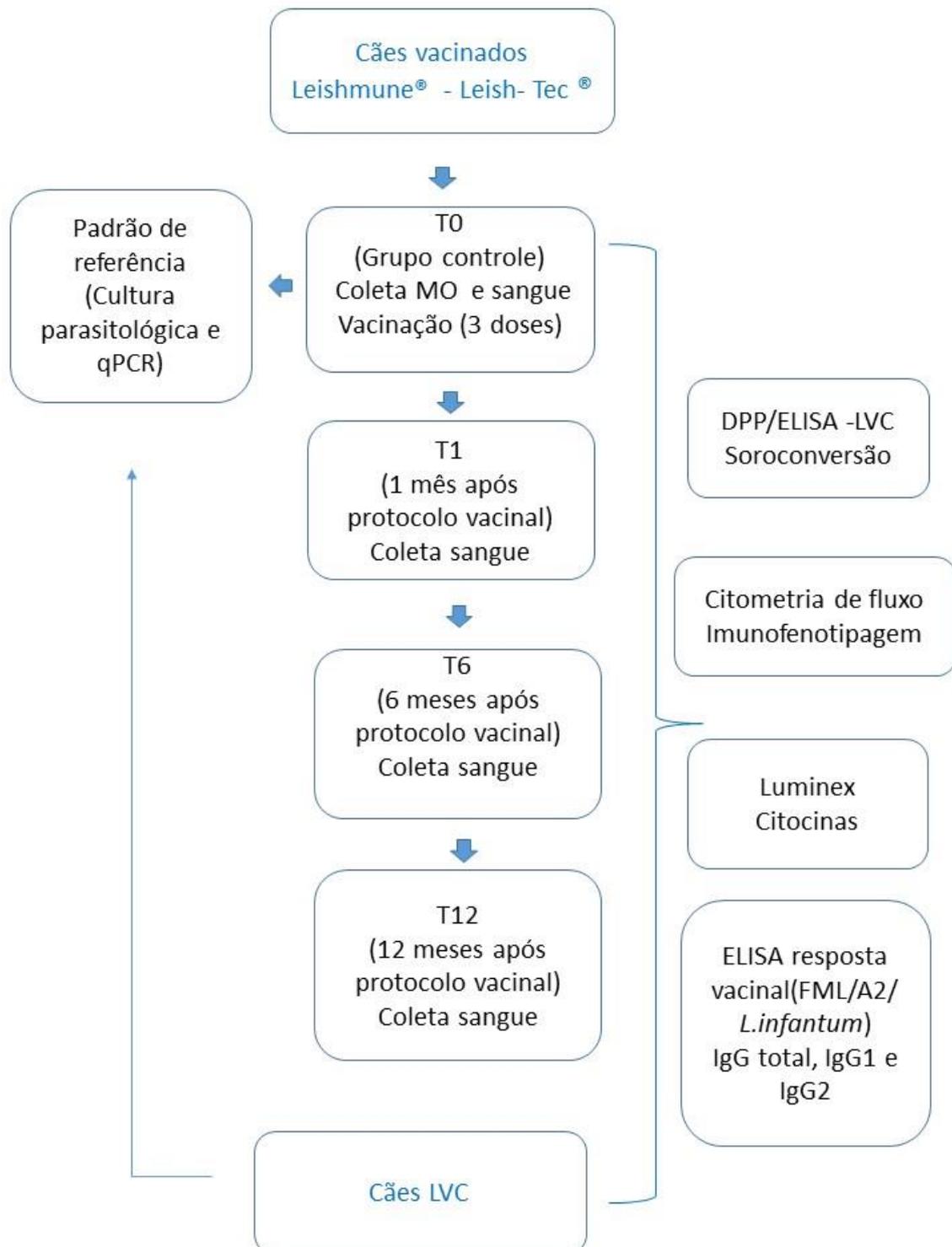
Tempo 12: (12 meses após término do protocolo vacinal): Exames clínicos, coleta de sangue venoso.

- GRUPO DE CÃES INFECTADOS:

Este grupo de cães, não foram acompanhados por um ano como os demais, devido a questões éticas. Após exame clínico e sedação, sangue total e medula óssea foram coletados para a realização dos exames do padrão de referência e outras técnicas utilizando a mesma metodologia empregada nos animais imunizados. Após esse procedimento, foi realizada a eutanásia no Laboratório de Pesquisas Clínica em Dermatozoonoses- INI/Fiocruz (LAPCLIN-DERMZOO), utilizando superdosagem de tiopental sódico intravenoso até que as funções cardiorrespiratórias fossem interrompidas e houvesse a confirmação do óbito.

Os grupos de cães do estudo, etapas e exames realizados estão esquematizados no fluxograma 1.

Fluxograma 1: Grupos de cães incluídos no estudo, tempo de acompanhamento dos cães vacinados e exames realizados.



LVC: leishmaniose visceral canina, DPP- LVC - Dual Path Platform, Reação em cadeia da polimerase quantitativa -qPCR, ELISA – ensaio imunoenzimático, MO: Medula óssea.

4.3 Obtenções das amostras de sangue e de medula óssea

No grupo controle (T0) e nos cães naturalmente infectados foram coletados amostra de medula óssea. Para isso, os cães foram sedados, utilizando cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado à acepromazina (0,2 mg/kg) por via intramuscular.

Para a coleta de medula óssea foi realizada a tricotomia, higienização com água e sabão e antissepsia com álcool a 70% e álcool iodado no manúbrio esternal. Foi introduzido uma agulha 1,2X40 mm e seringa de 20 mL. O material aspirado foi, em parte, acondicionado em meio de cultura NNN/Schneider (Laboratório de Vigilância em Leishmaniose INI - Fiocruz) para cultura parasitológica e uma parte acondicionada em tubo com EDTA (Becton Dickinson – BD, Nova Jersey, EUA) para a realização da qPCR. O animal foi considerado positivo quando pelo menos uma das técnicas fosse positiva.

A coleta de sangue foi realizada em todos os cães do estudo (Controle (T0), Vacinados (T1, T6 e T12) e naturalmente infectados), através de venopunção cefálica ou jugular a vácuo, utilizando escalpe Vacutainer® (Becton Dickinson – BD, Nova Jersey, EUA). Foram coletados dois mL de sangue sem anticoagulante para a separação do soro e realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e o DPP LVC (BioManguinhos®/FIOCRUZ, Brasil) e cerca de 15 mL divididos em dois tubos contendo heparina (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria) para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

4.4 Avaliação dos efeitos adversos

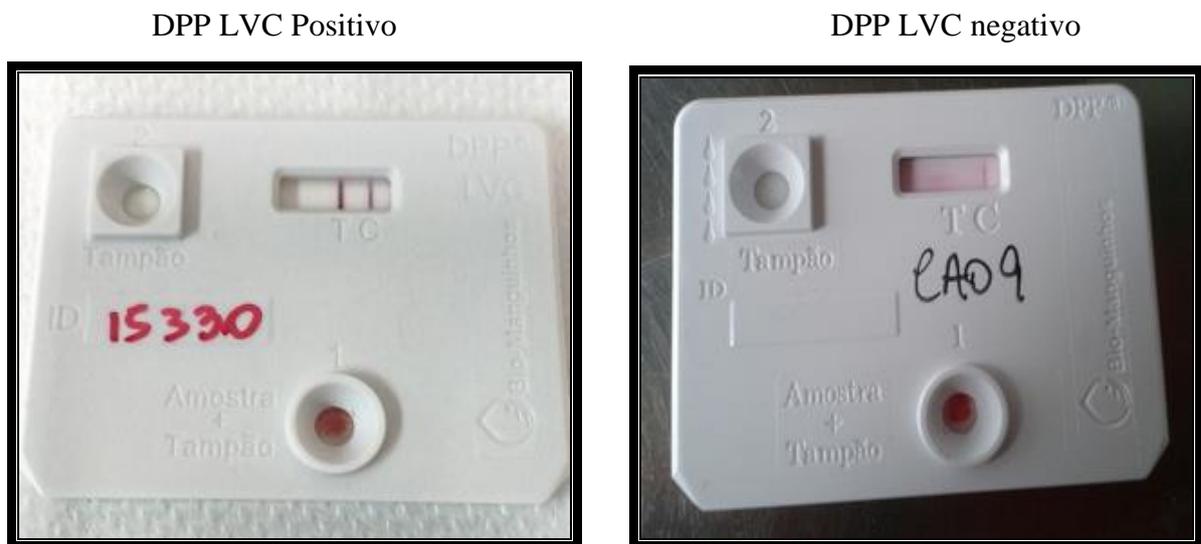
O grupo de cães vacinados foi monitorado por médicos veterinários por até 48 horas após a para observação de possíveis efeitos adversos pós-vacinais, descritos na bula, tais como: dor, inflamação e alopecia transitória no local da aplicação, além de letargia ou anorexia, reações alérgicas ou anafiláticas. A avaliação foi através da inspeção e palpação do local da aplicação e observação do comportamento dos cães.

4.5. DPP - *Dual Path Platform* – DPP LVC.

Este teste foi utilizado para o diagnóstico no Tempo 0 e como controle de soroconversão e infecção após as vacinações nos Tempos de estudo (T1, T6, T12 e infectados).

Foi utilizado um volume aproximado de 5 μ L de sangue ou soro sem anticoagulante para a realização do teste imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* – DPP[®] LVC. O teste foi considerado positivo quando as duas faixas, a referente à amostra e a do controle do teste, foram visíveis (Figura 1).

Figura 1: *Dual Path Platform* – DPP[®] LVC, teste imunocromatográfico para Leishmaniose Visceral Canina.



Fonte: Lapclin – Dermzoo/INI/Fiocruz

4.6 Ensaio Imunoenzimático diagnóstico (ELISA LVC)

Este teste foi realizado caso o DPP- LVC fosse positivo em algum tempo, como teste confirmatório, conforme recomendação do MS (nota técnica conjunta -01/2011)

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 Biomanguinhos/Fiocruz. Os testes foram realizados segundo as instruções do fabricante (Biomanguinhos- Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil).

4.7 Padrão de referência do estudo

4.7.1 Isolamentos parasitários em meio de cultura

As amostras de punção de medula óssea foram semeadas e incubadas em meio de cultura NNN/Schneider e em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco, buscando evidenciar crescimento de formas promastigotas, como descrito anteriormente por Madeira e colaboradores (2009a).

4.7.2 Realização da técnica de qPCR para diagnóstico da LVC.

- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE MEDULA ÓSSEA

A extração do DNA de medula óssea foi feita utilizando o “kit” DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®, Hilden, Alemanha), na plataforma semi automatizada de extração de ácidos nucleicos Qiacube (Qiagen® Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi identificado e estocado a -20°C.

- AMPLIFICAÇÃO DO kDNA PELA qPCR.

Após a extração, as amostras foram amplificadas utilizando sondas de hidrólise (sistema TaqMan®) na plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA). Cada amostra foi testada em triplicata.

A sonda de hidrólise (TaqMan® MGB) e o PCR foram desenhados visando 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) utilizados foram descritos anteriormente no protocolo de Francino e colaboradores (2006).

O volume final da reação foi de 25 µL, 5 µL de amostra e 20 µL de mix contendo 12,5 µL de Universal Mastermix (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA), 1,5 µL dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900 nM e 2,5 µL da sonda a 200 nM e 2 µL de água ultra pura.

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 (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) que foi vedada com filme adesivo (Applied Biosystems®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) após a pipetagem da reação.

Para a quantificação, em cada placa foi utilizada uma curva padrão confeccionada com cultura de *L. infantum* representando os pontos de 2.500, 250, 25, 2,5, 0,25 Equivalente genômico (gEq) de *L. infantum*/reação de qPCR (CAMPOS, et al. 2017b).

Em cada amplificação foram usados controles positivos e negativos e o *threshold* 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 apresentaram sinal de fluorescência após o ciclo 37 foram consideradas indetectáveis.

4.8 Resposta imune humoral

4.8.1 Detecção de anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2) específicos para as proteínas FML, A2 e extrato total de promastigotas de *L. infantum* por ELISA.

Para avaliar a produção de anticorpos específicos no soro dos cães imunizados foi utilizado a proteína A2 presente na vacina Leish-Tec® e o FML presente na Leishmune®. Adicionalmente, o soro dos cães imunizados, foram avaliados quanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando o extrato total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg). Todos os soros dos cães naturalmente infectados também foram testados para os antígenos vacinais e LiAg.

Para todos os ensaios de ELISA foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (Nunc® maxisorp). As placas foram incubadas individualmente com os antígenos LiAg, proteína A2 ou FML a 1 µg por poço, todos solubilizados em PBS (phosphate buffered saline) e acondicionadas a 4° C por 24 h. Posteriormente as placas foram lavadas com tampão de lavagem seguido da adição dos soros caninos diluídos a 1:100 em duplicata. Para detecção de IgG total e das subclasses foram utilizados 100µL de conjugado acoplados a peroxidase na diluição de 1:1.000 para IgG total, 1:50.000 para IgG1 e 1:300.000 para IgG2 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA).

Foram utilizados os reagentes presentes no “kit” EIE-leishmaniose-Biomanguinhos (EIE-LC) produzidos por Bio-manguinhos/Fiocruz, seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm.

Para determinar a resposta vacinal (FML e A2) e ao LiAg foi determinado um *Cut off* estipulado pela média dos resultados obtidos no grupo controle somado a um desvio padrão.

O índice de reatividade foi determinado pela medias da densidade óptica do ELISA dividido pelo *Cut off*. Aqueles animais que apresentaram índice de reatividade até 1, foram considerados como não respondedores, acima de 1 a 2,0 médio respondedores e acima de 2,0 alto respondedores (FERREIRA, et al. 2014)

4.9 Resposta imune celular

4.9.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Para obtenção das PBMCs, cerca de 15 mL de sangue com heparina foram diluídos em um tubo Falcon na proporção 1:1 em meio RPMI 1640® (Gibco, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) completo (contendo 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 50µM β-Mercaptoetanol, 100U/mL Penicilina, 100µg/mL Streptomicina) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB- Hyclone – USA). Posteriormente foi realizada a separação das células mononucleares utilizando o gradiente de ficoll-hypaque densidade 1077 (Histopaque® - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Em uma proporção ficoll/sangue diluído de 1:2 e posteriormente o tubo foi centrifugado 1245g por 20 minutos à 20⁰C sem freio (HERAEUS®, UK). Após a centrifugação, houve a formação de um anel contendo o PBMC que foram coletados com o auxílio de pipeta Pasteur. As células foram lavadas duas vezes a 500 g, 10 minutos a 7°C com o meio RPMI completo. O sedimento celular foi contado, e ressuspense em meio de congelamento (SFB contendo 10% de DMSO - Sigma-Aldrich) e as células ajustadas na concentração de 1x10⁷/mL. Posteriormente, foram acondicionadas em frascos de congelamento lento (Mr. Frosty®, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e conservadas a -80°C até o dia seguinte (aproximadamente 16h), quando foram transferidas para tanque de nitrogênio líquido -196°C para armazenamento e posterior utilização.

4.9.2 Descongelamento de células de sangue periférico para uso em citometria de fluxo.

Os microtubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho maria à 37°C. Em seguida, o volume de células contido nos microtubos, foi vertido em tubos de 15 mL de polipropileno (Corning, Nova York, EUA) sendo adicionados 10 mL de meio RPMI® completo, para as sucessivas lavagens (500g, 10 minutos). Após duas lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI para a determinação da concentração celular e viabilidade celular por contagem em hemocitômetro de Neubauer na diluição de 1:100 com o corante vital Azul de Trypan (Trypan Blue Solution 0,4% - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Foram consideradas como aptas a serem utilizadas nos ensaios experimentais células que possuíam viabilidade celular superior a 95%. Por conseguinte, as células foram ajustadas na concentração de 3×10^6 a 1×10^7 /mL em meio RPMI® completo suplementado com 10% SFB, para a realização dos experimentos *ex vivo*.

4.9.3 Imunofenotipagem celular *ex vivo* por citometria de fluxo

Um total de 3×10^6 a 1×10^7 células por poço foram adicionadas a placas de 96 poços de fundo em U (Nunc®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA). As células de um mesmo animal nos diferentes tempos de estudo foram utilizadas em um mesmo ensaio. Para tal, cada amostra foi testada 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 ressuspensas em 30 µL de tampão FACS (PBS contendo 0,1% de albumina bovina sérica - BSA - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O outro poço de cada amostra recebeu 30 µL do mix de anticorpos monoclonais específicos para imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos, que estão descritos na Tabela 1.

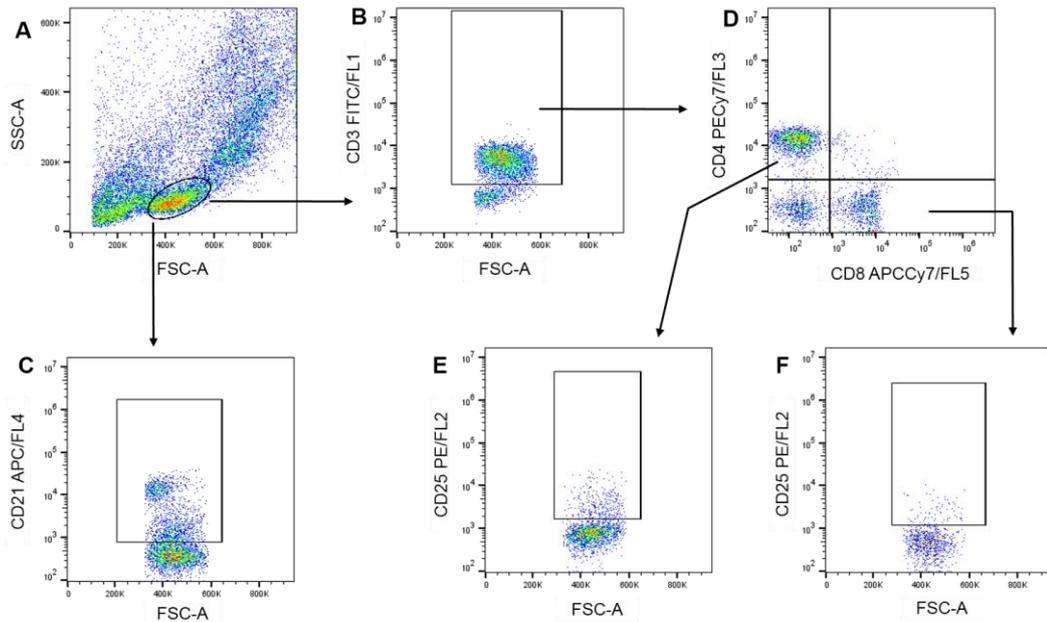
As amostras foram incubadas à temperatura 4°C, em ausência de luz por 30 minutos. Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes a 500 g por 5 minutos, e as células ressuspensas em 200 µL de tampão FACS e transferidas para mini-tubos de 1 mL (Nuclon®, EUA), para utilização no citômetro de fluxo CytoFlex (BeckmanCoulter, CO, EUA), que pertence à plataforma de citometria de fluxo, núcleo de *cell sorting* do IOC/Fiocruz. Um total de 30.000 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 2.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais (Serotec - Oxford, Inglaterra), utilizados para imunofenotipagem celular do PBMC canino.

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 ou E-Fluor 450	YCATE55.9	1:5 ou, 1:30	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>

Figura 2: 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 controle, imunizados nos 3 tempos de estudo e 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) Gráfico de distribuição pontual CD3/FL1 versus FSC, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfócitos T totais ou (C) linfócitos B totais (CD21/FL4) (D) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL3 versus CD8/FL5, contendo as células selecionadas positivas para CD3, empregado para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T $CD3^+$. (E) e (F) Gráfico de distribuição pontual de CD25/FL2 versus FSC, provenientes da região contendo as células TCD3⁺CD4⁺ ou TCD3⁺CD8⁺.

4.9.4 Extrato total de promastigotas de *L. infantum* (LiAg).

Para estímulo das PBMCs foram utilizadas promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), submetidas a 10 ciclos de congelamento e descongelamento (-196°C e 37°C respectivamente) e aplicação de ultrassom (40 Watts/15

min). Posteriormente foi realizada a dosagem de proteínas e a preparação ajustada para 1mg/mL e estocada a -80°C até o momento de uso.

*4.9.5 Quantificação de citocinas em culturas de PBMCs estimuladas com extrato total de promastigotas de *L. infantum* pelo método de Luminex®.*

Um total de 1×10^6 PBMCs obtidas de cada cão foram independentemente estimuladas em placas de 24 poços (Nunc®, by Thermo Fischer Scientific®, MA, EUA) na presença de 1µg/mL de Concanavalina A (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 10µg/mL de LiAg ou na ausência de estímulo exógeno por 72h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (NAPCO, Nova York, EUA). Os sobrenadantes de culturas foram coletados após 72 horas de cultivo e estocados a -80°C para posterior dosagem de citocinas utilizando o kit de alta sensibilidade MILLIPLEX MAP Canine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, CCYTOMAG-90K (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) para avaliação das seguintes citocinas: IFN- γ , IL-10, IL -6, IL -8, TNF- α .

Os ensaios de Luminex foram realizados em uma placa de 96 poços que contém uma membrana de filtração na sua base seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram lidas e analisadas na plataforma de microesferas (Luminex® 200™, Milipore, Massachussets, EUA), para quantificação de fluorescência emitida pelas microesferas. O limite de detecção foi estipulado pela média de concentração mínima detectável + 2 desvios padrões de acordo com o fabricante. Os limites foram 18 pg/mL para IFN- γ , 8,5 pg/mL para IL-10, 3,7 pg/mL para IL-6, 21,7pg/mL para IL-8 e 6,1 pg/mL para TNF- α .

4.10 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 tempos) 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%.

4.11 Aspectos éticos

O protocolo para obtenção de todas as amostras clínicas e vacinação dos animais foi aprovado pelo CEUA/IOC com o número L-45/2015 (Anexo 1).

O protocolo para obtenção das amostras clínicas dos animais infectados foi aprovado pelo CEUA/Fiocruz com o número LW-4/17 (Anexo 2).

5 RESULTADOS

5.1 Características da população de estudo

Dos 28 cães vacinados, ocorreram seis perdas de seguimento devido a mudança de canil, restando 22 (78,5%) cães. Doze (54,5%) cães do canil 1 foram imunizados com a Leish-Tec® e dez (45,4%) do canil 2 com a Leishmune®.

Dos cães imunizados com a Leish-Tec® seis (50%) eram fêmeas e seis (50%) machos, media de peso de 29,2 Kg (min: 18 Kg, max: 50 Kg), com média de idade de 34,2 meses (min: 11 meses, max: 66 meses), todos com bom estado geral e com raças definidas (quatro Pastores Malinois, quatro Rottweiller, um labrador e três Pastores Alemães) (Tabela 2).

Dos cães imunizados com a Leishmune® nove (90%) eram machos e uma (10%) fêmea, media de peso de 29,8 Kg (min: 20 Kg, max: 42,3 Kg), com média de idade de 34,5 meses (min: 9 meses, max: 96 meses), todos com bom estado geral e com raças definidas (quatro Pastores Malinois, dois labradores, três Pastores Alemães e um American Staffordshire) (Tabela 2).

O grupo de cães naturalmente infectados, não vacinados compreendeu 18 cães, 12 (66,6%) machos e seis (33,3%) fêmeas, media de peso de 10,6 Kg (min:5 Kg, max: 15 Kg), com média de idade de 60 meses (min: 24 meses, max: 192 meses), quatro (22,2%) com estado geral regular e 14 (77,7%) com estado geral ruim, três com raças definidas (um poodle, um dachshund e um pinsher) e 15 sem raças definidas (Tabela 2).

Tabela 2: Características da população canina imunizadas com a Leishmune® e Leish-Tec® e naturalmente infectada por *L. infantum*.

CARACTERÍSTICAS	LEISH-TEC® (n=12)	LEISHMUNE® (n=10)	LVC (n=18)
Sexo	6 machos/6 fêmeas	9 machos/1 fêmea	12 machos/ 6 fêmeas
Peso*	29,2 Kg (18 a 50 Kg)	29,8 Kg (20 a 42,3 Kg)	10,6 Kg (5 a 15 Kg).
Idade*	34,2 meses (11 a 66 meses)	34,5 meses (9 a 96 meses)	60 meses (24 a 192 meses)
Estado Geral	Bom	Bom	4 regular/14 ruim
Raça	RD	RD	15 SRD/ 3 RD

LVC: Leishmaniose visceral canina, * valores de média, RD: Raça definida, SRD: Sem raça definida. Estado geral bom: sem sinais clínicos, regular: sinais clínicos leves (descamação, linfomegalia regional, esplenomegalia ou hepatomegalia), ruim: sinais clínicos graves (onicogrifose, alterações oftálmicas, caquexia e hepatoesplenomegalia).

5.2 Avaliação dos efeitos adversos

Após a vacinação os animais foram supervisionados por até 48 horas, mas não foram observados efeitos adversos relacionados a vacina.

5.3 Resultados do padrão de referência e soroconversão

Os resultados do padrão de referência (cultura parasitológica e qPCR), DPP- LVC e ELISA dos grupos de cães vacinados e no grupo de cães naturalmente infectados estão apresentados no quadro 1.

Todos os cães imunizados foram negativos antes da vacinação (T0) na cultura parasitológica e qPCR.

Os cães dos dois grupos imunizados apresentaram resultados negativos no DPP-LVC em todos os tempos de estudo, exceto um cão imunizado com a vacina Leish-Tec® que soroconverteu no DPP LVC no T6 (após 6 meses do protocolo vacinal). Neste cão, foi realizada novamente a coleta de medula óssea e sangue. Os resultados na qPCR, cultura parasitológica e ELISA LVC foram negativos. Após 12 meses (T12) o resultado do DPP LVC deste cão foi negativo.

Parte dos resultados de soroconversão foram publicados atendendo ao segundo objetivo da tese (Apêndice 2).

Dos 18 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, quatro cães foram classificados de acordo com os sinais clínicos apresentados. O critério utilizado para determinar o grau de doença (leve ou grave) foi estabelecido pelo tipo de sinal clínico e se estavam isolados ou associados a outros sinais. Os cães com doença leve apresentaram no momento da avaliação clínica, sinais clínicos isolados compatíveis com LVC como, descamação, linfomegalia regional, esplenomegalia ou hepatomegalia. Quatorze cães foram classificados como doença grave, pois apresentaram sinais clínicos graves e associados, como onicogribose, alterações oftálmicas, caquexia e hepatoesplenomegalia.

Os 18 cães foram positivos na cultura parasitológica e 16 (88,8%) na qPCR. Quanto a quantificação da qPCR, nos cães com doença leve a média foi de 24,5 gEq, mediana de 0,98 gEq (Max: 72,3 - Min: 0,32). Nos cães com doença grave a média foi de 5.137,07 gEq, mediana 48,4 gEq (Max: 52.326,43 – Min: 0,020469879).

Quadro 1: Resultados dos testes realizados para controle de soroconversão (DPP LVC e ELISA) e padrão de referência (qPCR e cultura parasitológica) nos cães imunizados e nos animais naturalmente infectados.

CÃES	TESTES			
		DPP-LVC (Biomanguinhos®)	ELISA-LVC (Biomanguinhos®)	PADRÃO DE REFERÊNCIA (cultura e qPCR)
GRUPO LEISHMUNE® (n =10)	T0	10 NEGATIVOS	NA	10 NEGATIVOS
	T1	10 NEGATIVOS	NA	NA
	T6	10 NEGATIVOS	NA	NA
	T12	10 NEGATIVOS	NA	NA
GRUPO LEISH-TEC® (n =12)	T0	12 NEGATIVOS	NA	12 NEGATIVOS
	T1	12 NEGATIVOS	NA	NA
	T6	11 NEGATIVOS 1 POSITIVO	1 NEGATIVO	1 NEGATIVO
	T12	12 NEGATIVOS	NA	NA
GRUPO NATURALMENTE INFECTADOS (n =18)		18 POSITIVOS	18 POSITIVOS	18 POSITIVOS NA CULTURA 16 POSITIVOS NA qPCR

DPP® - Dual Path Platform - DPP LVC, qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa, ELISA – ensaio imunoenzimático, NA – Não se aplica a método. T0: Antes do protocolo vacinal, T1: um mês após o protocolo vacinal, T6: 6 meses após o protocolo vacinal, T12: 12 meses após o protocolo vacinal.

5.4 Resultados da detecção de anticorpos (IgG, IgG1 e IgG2) específicos para as proteínas FML, A2 e extrato total de promastigotas de *L. infantum*.

Para as análises da resposta imune humoral foram utilizados os soros de 12 cães imunizados com a Leish-Tec®®, 10 com a Leishmune® e 10 cães naturalmente infectados por *L. infantum* (LVC).

5.4.1 Níveis de anticorpos específicos (IgG, IgG1 E IgG2) para a proteína A2 e LiAg no soro de cães imunizados com a Leish-Tec® e cães naturalmente infectados.

Os cães imunizados foram testados quanto a presença de anticorpos anti-*L. infantum*. Nos cães vacinados com a Leish-Tec®, não foram observadas diferenças nos níveis de IgG total e IgG1 durante o acompanhamento dos cães (T1, T6 e T12) em comparação com o controle (T0), porém a subclasse IgG2 no T6 e T12 (6 meses e 12 meses) estava significativamente diminuída.

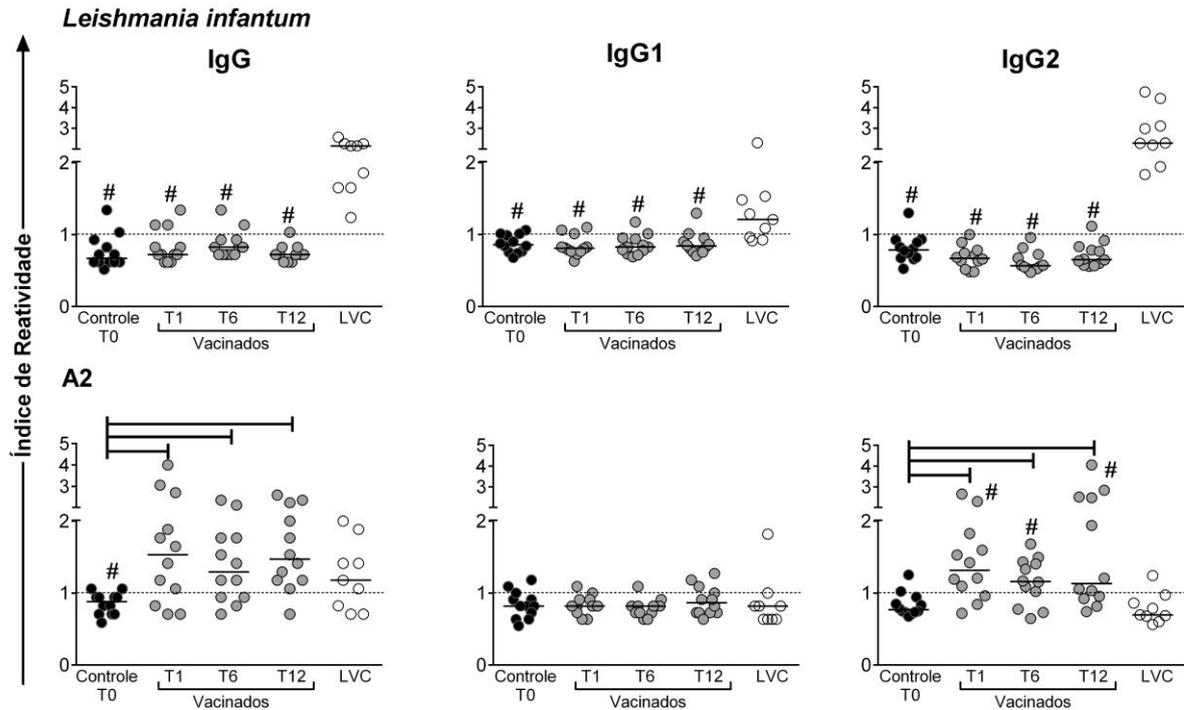
Os cães doentes apresentaram níveis significativamente maiores de anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2) anti-*L. infantum* do que os cães controle e vacinados com a Leish-Tec®, em todos os tempos (T1, T6 e T12) (Figura 3).

Os cães imunizados com a Leish-Tec® apresentaram títulos variados de anticorpos anti-A2, os níveis de IgG total, aumentaram após a vacinação e se mativerem elevados até 12 meses após o término do protocolo vacinal, os animais positivos para LVC também apresentaram títulos de anticorpos anti-A2 maiores que o grupo controle (T0) (Figura 3).

Este aumento está relacionado ao aumento da subclasse IgG2 anti-A2, que possui o mesmo perfil observado para IgG total, tendo sido observado ainda que, após a vacinação, os níveis de IgG2 eram estatisticamente mais elevados nos grupos vacinados do que nos cães portadores de LVC (Figura 3).

Não foram observadas diferenças nos níveis de IgG1 específicos para a proteína A2 entre os cães vacinados nos diferentes tempos pós-vacinação (T1, T6 e T12) quando comparados aos controles (antes da vacinação-T0) e aos animais naturalmente infectados (Figura 3).

Figura 3: Índice de reatividade (níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2) de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® e no grupo de cães naturalmente infectados anti A2 e antígeno de *L. infantum*.



T0 (n=12) cães controle, T1 (n=12) um mês após o protocolo vacinal, T6 (n=12) seis meses após, T12(n=12) 12 meses. Foram usados como controle positivo os soros de 10 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Para comparação entre os grupos controle e imunizados foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre amostras de grupos diferentes (vacinaados x LVC). Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$ com intervalo de confiança de 95%, # significativamente diferentes cães controle (T0) e/ou vacinaados de cães com LVC).

5.4.2 Níveis de anticorpos específicos (IgG, IgG1 E IgG2) para o FML e LiAg no soro de cães imunizados com a Leishmune® e cães naturalmente infectados.

Nas respostas de anticorpos específicos anti-*L. infantum*, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IgG total no período de 1 mês e 6 meses após a imunização (T1 e T6) em comparação ao grupo controle. No T12 os níveis foram semelhantes ao controle (Figura 4).

Nos cães infectados, níveis mais elevados de IgG específicos para *L. infantum* foram detectados, no soro, quando comparados ao grupo controle e ao grupo imunizado (Figura 4).

Nas subclasses IgG1 e IgG2 anti-*L. infantum* não foram observadas diferenças nos cães vacinaados após a imunização (T1, T6 e T12). Já nos cães naturalmente infectados os

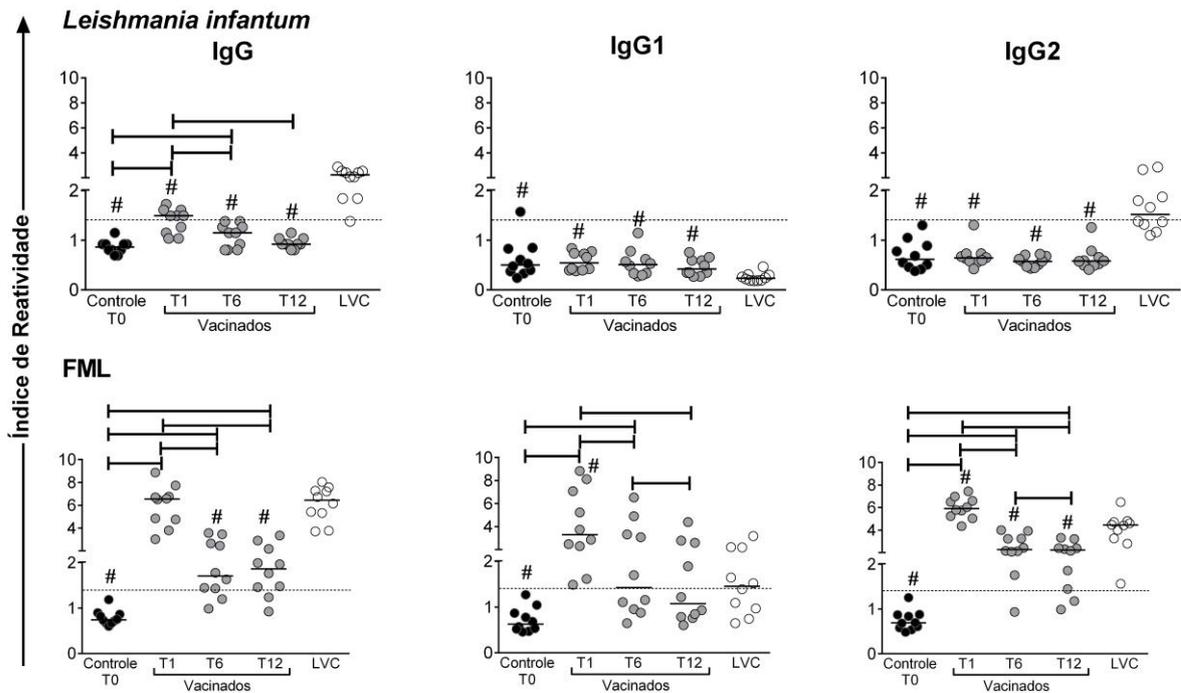
níveis de IgG2 foram maiores do que nos cães vacinados. De maneira oposta animais naturalmente infectados apresentaram níveis menores de anticorpos IgG1 anti-*L. infantum* no soro, em relação aos controles sadios e ao grupo de cães vacinados, durante todo o período de avaliação (T0, T1, T6 e T12) (Figura 4).

Nos cães imunizados com a Leishmune®, no T0 (controle) foram observados baixos níveis de anticorpos IgG total anti-FML. No T1 houve um aumento significativo dos níveis de anticorpos, e nos outros tempos (T6 e T12) os níveis diminuíram, mas ainda continuaram significativamente maiores que as taxas basais (T0 controle). Os cães doentes produziram níveis de anticorpos significativamente maiores que os cães imunizados (Figura 4).

Do mesmo modo, os cães controle (T0) não responderam ou foram pouco responsivos para anticorpos da subclasse IgG1 anti-FML, com aumento após a imunização no T1 principalmente, diminuindo nos outros tempos e no T12 quase retornando a níveis basais. Os cães com LVC apresentaram níveis significativamente menores que os vacinados (Figura 4).

Nos anticorpos IgG2 anti-FML, no T0 os cães não responderam, ocorrendo resposta significativamente maior em T1. Embora os níveis tenham diminuído em T6 e T12 quando comparados com T1, eles permaneceram significativamente maiores que o controle (T0). Os cães naturalmente infectados apresentaram altos títulos de anticorpos significativamente maiores que dos cães vacinados em T0, T6 e T12 (Figura 4).

Figura 4: Índice de reatividade (níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2) de cães imunizados com a vacina Leishmune® e no grupo de cães naturalmente infectados anti – FML e antígeno *L. infantum*.



T0 (n=12) cães controle T0 (n=12), T1 (n=12) um mês após o protocolo vacinal, T6 (n=12) seis meses após, T12 (n=12) 12 meses. Foram usados como controle positivo os soros de 10 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Para comparação entre os grupos controle 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%, # significativamente diferentes cães controle (T0) e/ou vacinados de cães com LVC.

Foi avaliada também a resposta imune humoral em relação a porcentagem de cães que apresentavam soros reagentes para as proteínas vacinais respectivas e ao extrato total de promastigotas de *L. infantum*. Foi observado que dos cães imunizados com Leish-Tec®, 75% apresentaram positividade na resposta de anticorpos IgG total específicos a proteína A2 no T1. Essa positividade diminuiu no T6 (66,7%), mas voltou a subir no T12 (91,7%). Quando observada a positividade através dos tempos estudados, somente um cão imunizado com Leish-Tec® não respondeu em nenhum tempo do estudo (Tabela 3).

Esses mesmos cães quando avaliados quanto a produção de anticorpos IgG anti- *L. infantum*, possuíam positividade de 25% no T1, 16,7% em T6 e 9% dos cães apresentaram resposta no T12. No somatório dos tempos 41,6% dos cães responderam em algum tempo para antígenos de *L. infantum*. (Tabela 3)

No grupo de cães vacinados com a Leishmune® 100% apresentaram resposta positiva a proteína FML no T1, e 90% dos cães responderam em T6 e T12. Quanto à presença de anticorpos anti- *L. infantum*, todos os cães foram positivos no T1 (100%), 60% dos cães no T6 e 30% no T12 (Tabela 3).

Cerca de 70% dos cães infectados apresentaram resultado positivo para IgG total anti proteína A2, 100% para a proteína FML e em 100% observamos resposta positiva ao extrato total de *L. infantum*. (Tabela 3).

Quanto as repostas vacinais na subclasse IgG1 os cães imunizados com a Leish-Tec® 8,3% responderam no T1 e T6 e 25% no T12 com anticorpos anti-A2. 66,6% não responderam em nenhum dos tempos. Nos cães vacinados com a Leishmune® os anticorpos anti-FML, no T1 100% responderam, tendo diminuído em T6 (70%) e T12 (50%). (Tabela 4)

No grupo de cães imunizados com Leish-Tec® 25% responderam ao antígeno de *L. infantum* no T1 e 16,7% no T6 e T12 (Tabela 4).

Nos cães infectados, 10% responderam com anticorpos IgG1 anti-A2 e 70% anti-FML (Tabela 4).

Quanto a avaliação da subclasse IgG2 anti- A2, foi observado nos cães vacinados com a Leish-Tec® que 75% responderam no T1 e T6 e 66,6% no T12. Todos foram reagentes em algum tempo do estudo. Nos cães imunizados com a Leishmune® os anticorpos IgG2 anti FML, 100 % responderam em T1 e 90% em T6 e T12. (Tabela 5)

Em relação as repostas ao antígeno de *L. infantum* nenhum cão vacinado com a Leish-Tec® respondeu em T1 e T6 e 8,3% no T12. Dos cães vacinados com a Leishmune® 10% responderam em T1, nenhum em T6 e 10% em T12 (Tabela 5)

Nos cães infectados, 10% responderam com anticorpos IgG2 anti-A2, 100% anti-FML e 100% anti- *L. infantum* (Tabela 5).

Tabela 3 - Comparação da resposta vacinal (IgG total) dos cães imunizados em diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses, T12-12 meses) e dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Sensibilização da placa	Imunização	Cut off (Média T0 + 1 desvio padrão) IgG total	T1 %	T6 %	T12 %	Positividade (T1 e/ou T6 e/ou T12)	LVC N=10
FML	Leishmune® n=10	0,11	100%	90%	90%	100%	100%
A2	Leish-Tec® n= 12	0,08	75%	66,7%	91,7%	91,7%	70%
<i>L. infantum</i>	Leishmune® n=10	0,09	100%	60%	30%	100%	100%
<i>L. infantum</i>	Leish-Tec® n= 12	0,09	25%	16,7%	9%	41,6%	100%

Tabela 4 - Comparação da resposta vacinal (IgG1) dos cães imunizados em diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses, T12 -12 meses) e dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Sensibilização da placa	Imunização	Cut off (Média T0 + 1 desvio padrão) IgG1	T1 %	T6 %	T12 %	Positividade (T1 e/ou T6 e/ou T12)	LVC N=10
FML	Leishmune® n=10	0,15	100%	70%	50%	100%	70%
A2	Leish-Tec® n= 12	0,11	8,3%	8,3%	25%	33,3%	10%
<i>L. infantum</i>	Leishmune® n=10	0,40	0	10%	0	10%	0
<i>L. infantum</i>	Leish-Tec® n= 12	0,08	25%	16,7%	16,7%	41,6	60%

Tabela 5 - Comparação da resposta vacinal (IgG2) dos cães imunizados em diferentes tempos (T0 – cães controle, T1- um mês após protocolo vacinal, T6- 6 meses, T12 12 meses) e dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Sensibilização da placa	Imunização	Cut off (Média T0 + 1 desvio padrão) IgG2	T1 %	T6 %	T12 %	Positividade (T1 e/ou T6 e/ou T12)	LVC N=10
FML	Leishmune® n=10	0,12	100%	90%	90%	100%	100%
A2	Leish-Tec® n= 12	0,09	75%	75%	66,6%	100%	10%
<i>L. infantum</i>	Leishmune® n=10	0,20	10%	0	10%	20%	100%
<i>L. infantum</i>	Leish-Tec® n= 12	0,12	0%	0%	8,3%	8,3%	100%

5.5 Resultados da imunofenotipagem celular

Foi possível realizar a imunofenotipagem em 12 cães imunizados com a Leish-Tec®, 10 com a Leishmune® e em 17 cães naturalmente infectados (4 com doença leve e 13 com doença grave)

Não foram observadas diferenças nos percentuais de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ entre os cães vacinados nos diferentes tempos pós-vacinação (T1, T6 e T12) quando comparados aos controles (antes da vacinação-T0), nos dois grupos de cães vacinados.

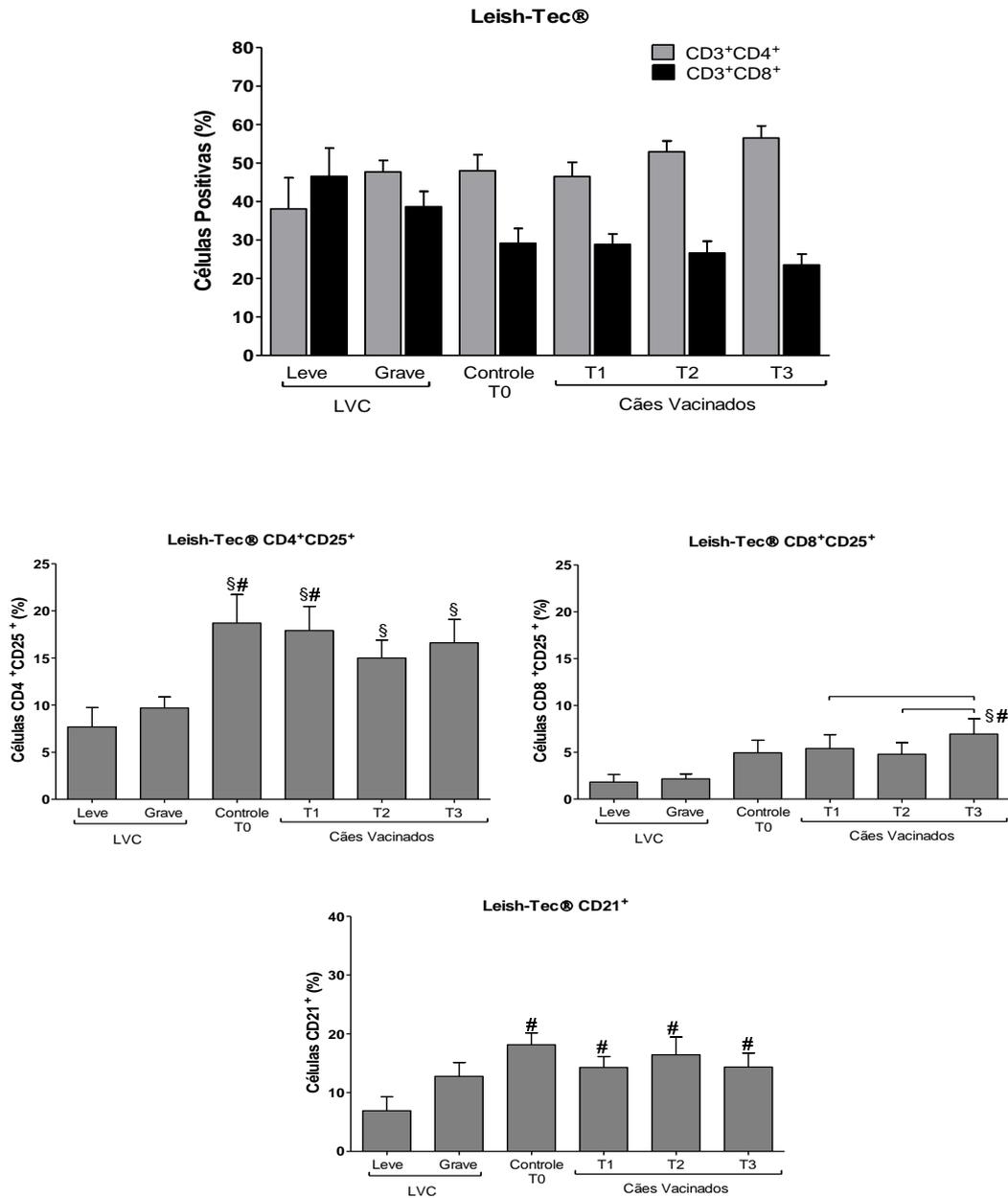
Nos grupos de cães naturalmente infectados (doença grave e doença leve) observamos um aumento nos percentuais de células T CD3⁺CD8⁺ em comparação aos percentuais encontrados no grupo controle (T0) e após a vacinação com a Leishmune® (T1, T6 e T12) (Figura 5) e Leish-Tec® (Figura 6), porém só foi observada significância estatística entre os cães doentes e aqueles imunizados com a vacina Leishmune®. De forma inversa, foi observada uma tendência a diminuição dos percentuais de células T CD3⁺CD4⁺ no sangue periférico dos animais infectados em relação aos grupos controle e pós vacinação, porém sem diferença estatística. No caso do grupo de animais com doença leve observamos uma inversão na razão CD4/CD8.

Não foram observadas diferenças nos percentuais de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e entre os cães vacinados nos diferentes tempos pós-vacinação (T1, T6 e T12) quando comparados aos controles (antes da vacinação-T0), nos dois grupos de cães vacinados (Figuras 5 e 6). Por outro lado, os percentuais de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ foram estatisticamente menores nos grupos de cães doentes quando comparados aos animais dos grupos controle (T0) e imunizados com as vacinas Leishmune® (Figura 5) ou Leish-Tec® (Figura 6)

Com relação às células T CD8⁺CD25⁺ observamos uma tendência a diminuição desse fenótipo celular nos grupos doentes em relação ao grupo controle. Por outro lado, animais imunizados apresentam uma tendência ao aumento desse tipo celular no sangue periférico, principalmente no período de 1 ano após a vacinação nos dois grupos vacinados (Figuras 5 e 6)

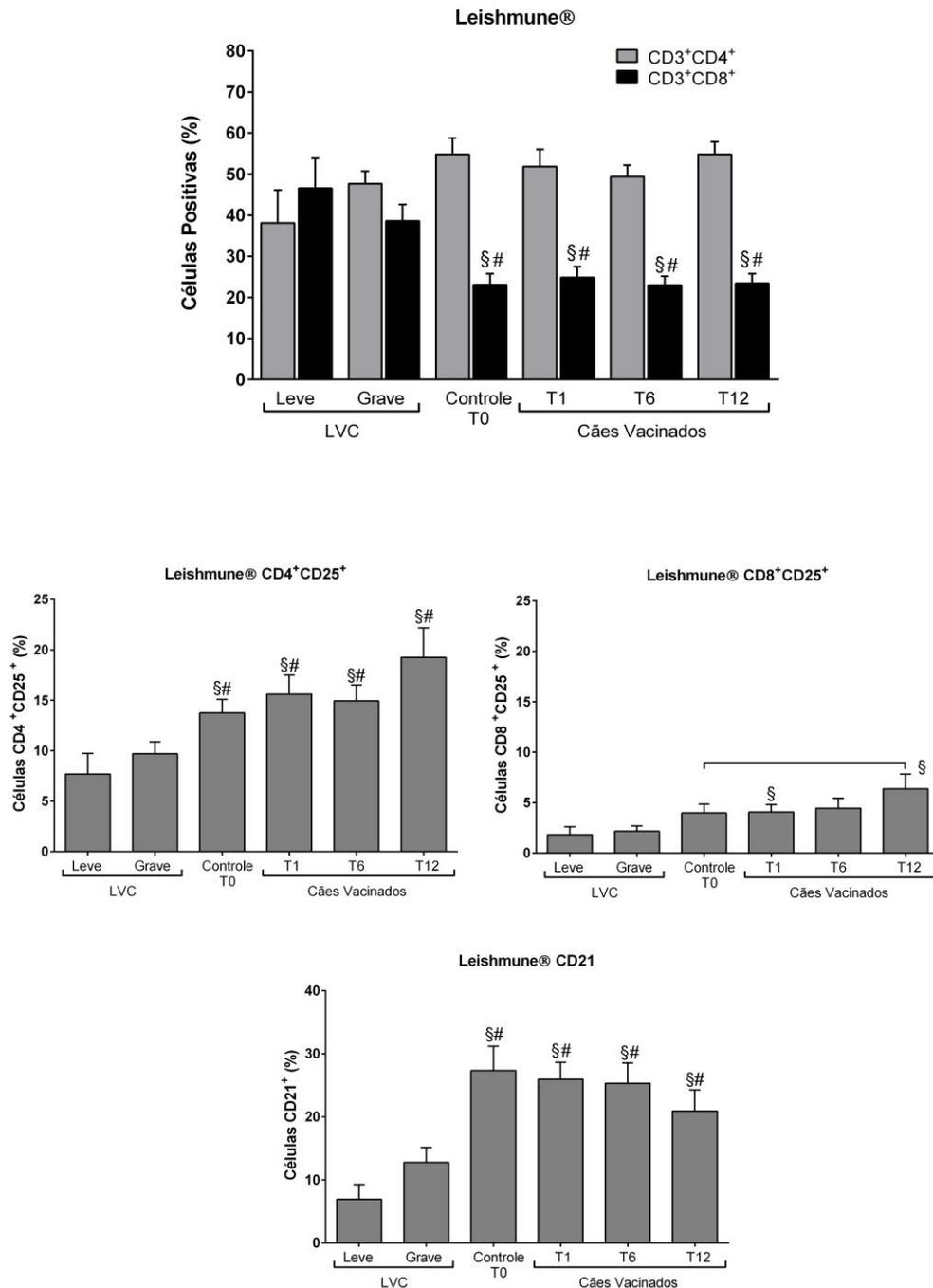
Foi possível observar ainda que os percentuais de linfócitos B (CD21⁺) se apresentam em menor percentual no grupo de animais com doença leve e grave, em relação aos grupos controle e vacinados com a vacina Leish-Tec® (Figura 5) e Leishmune® (Figura 6).

Figura 5: Representação dos percentuais dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD4, CD8, CD25) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães imunizados com a Leish-Tec® (n=12) comparado com um grupo de cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC), com sinais clínicos leve (n=4) e grave (n=13).



T0: cães controle, T1: um mês após o protocolo vacinal, T6: seis meses após o protocolo vacinal, T12: um ano após o protocolo vacinal. Doença leve: cães com leishmaniose visceral canina (LVC) com sinais clínicos leves, Doença grave: Cães com LVC com sinais clínicos graves. Para comparação entre os grupos controle 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%. # significativamente diferente de cães com doença leve, § significativamente diferente de cães com doença grave.

Figura 6: Representação dos percentuais dos fenótipos celulares de linfócitos T (CD4, CD8, CD25) e linfócitos B (CD21) presentes no sangue periférico de cães imunizados com a Leishmune® (n=10) comparado com um grupo de cães positivos para Leishmaniose visceral canina (LVC), com sinais clínicos leve (n=4) e grave (n=13).



T0: cães controle, T1: um mês após o protocolo vacinal, T6: seis meses após o protocolo vacinal, T12: um ano após o protocolo vacinal. Doença leve: cães com Leishmaniose visceral canina (LVC) com sinais clínicos leves, Doença grave: Cães com LVC com sinais clínicos graves. Para comparação entre os grupos controle 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%. # significativamente diferente de cães com doença leve, § significativamente diferente de cães com doença grave.

5.6 Resultados da quantificação de citocinas pelo luminex

Para a análise da produção de citocinas pelas PBMCs estimuladas com o extrato total de *L. infantum* foram utilizados sobrenadantes de culturas obtidos de seis cães imunizados com a vacina Leish-Tec®, cinco com a Leishmune®, e 10 cães doentes (LVC), quatro com doença leve e seis com doença grave. Não sendo possível utilizar os sobrenadantes de culturas de todos os cães do estudo devido ao alto custo da técnica.

Em todos os grupos foi observado variação na produção das citocinas, com cães em que foram detectados níveis muito baixos de citocinas nos sobrenadantes de cultura das PBMCs e outros em que a produção foi maior do que a média do grupo (outliers).

As médias de produção de citocinas após estímulo com a ConA do grupo de cães naturalmente infectados foram de 148,6 pg/mL de IFN- γ (SD= 219,8), 124,4 pg/mL de IL-10 (SD= 109,4), 1060,7 pg/mL de IL-8 (SD= 879,3) e 669,4 pg/mL de TNF- α (SD=924,5). Neste grupo não foi possível mensurar os níveis de IL-6 (missing). As médias de produção de citocinas após estímulo com a ConA nos cães imunizados estão descritos no quadro 2.

Quadro 2: Médias de produção de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados contra leishmaniose visceral canina após estímulo com a Concanavalina A.

IMUNIZAÇÃO	CITOCINAS (pg/mL)	T0 Média \pm DP	T1 Média \pm DP	T6 Média \pm DP	T12 Média \pm DP
LEISHMUNE®	IFN- γ	487,2 (171,5)	210,7 (169,0)	253,4 (269,4)	304,9 (263,3)
	IL-10	2634,1 (835,0)	20,2 (17,4)	61,2 (45,8)	276,6 (232,5)
	IL-6	109,0 (114,2)	173,5 (231,9)	110,8 (145,8)	127,12 (139,4)
	IL-8	2834,7 (180,7)	6564,7 (1437,1)	4669,9 (1253,8)	4510,9 (1224,4)
	TNF- α	628,6 (456,2)	778,97(602,3)	707,9 (1063,7)	1041,7 (676,4)
LEISH-TEC®	IFN- γ	838,4 (897,1)	522,9 (204,1)	484,0(178,7)	582,1(593,0)
	IL-10	291,5 (185,6)	688,1 (995,7)	129,2(112,6)	392,0(485,2)
	IL-6	15,7 (24,0)	56,2 (55,1)	334,4(44,5)	98,2(165,7)
	IL-8	15510,0(9377,8)	10851,4(1594,0)	6480,4(2868,8)	5530,8(1907,6)
	TNF- α	380,7 (429,3)	240,2 (100,1)	1590,0(770,7)	787,9 (572,6)

IFN-g: interferon gama IL: Interleucina, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, T0: cães controle, T1: um mês após o protocolo vacinal, T6: seis meses após o protocolo vacinal, T12: um ano após o protocolo vacinal. Dados expressos em média \pm Desvio Padrão (DP).

Quando estimulados com o LiAg, os níveis de IFN-g foram maiores nos cães imunizados com a Leishmune[®], quando comparados com o grupo da Leish-Tec[®] e infectados. Porém não foi observada diferença estatística (Figura 7).

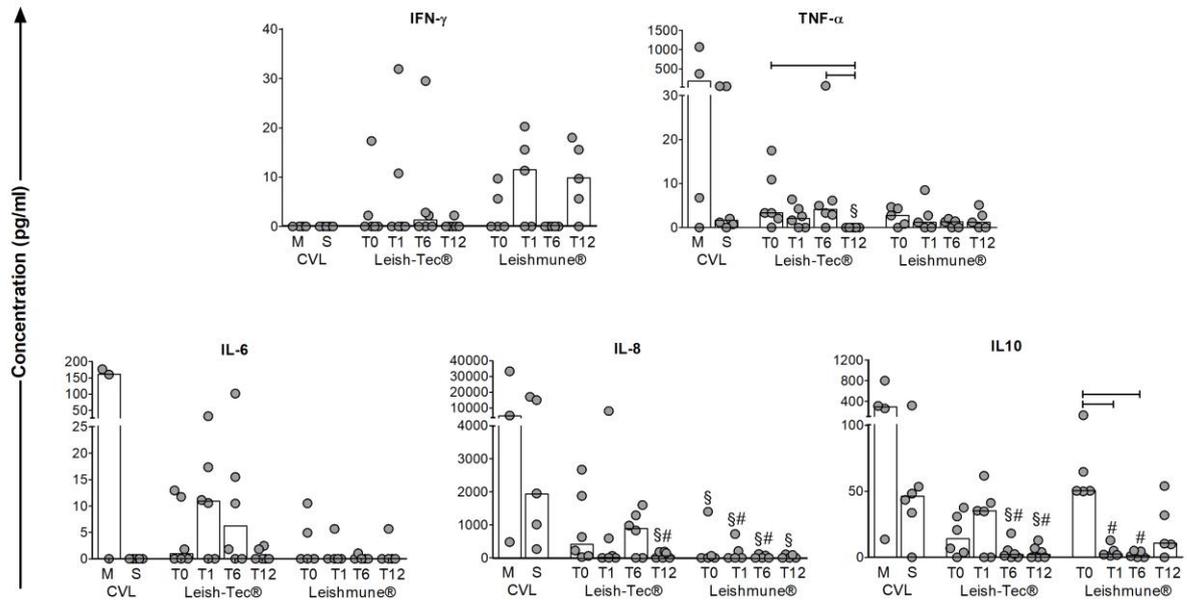
A produção de IL-8 foi maior nos cães doentes do que nos cães vacinados, com diferença estatística no T1 e T6 dos cães vacinados com a Leishmune[®] e T12 no grupo Leish-Tec[®]. Quando comparados os grupos vacinados, os cães da Leish-Tec[®] (PBMC) produziram maiores níveis de IL-8 (Figura 7).

Quanto à produção de TNF- α pelos PBMCs, os valores foram maiores nos cães infectados. Nos cães vacinados com a Leishmune[®] os níveis de TNF- α se mantiveram baixos e estáveis nos tempos do estudo (T0, T1, T6, T12). Nos cães da Leish-Tec[®] os níveis foram menores que o dos cães infectados, mas a produção variou nos tempos, diminuindo no T1 aumentando no T6 e voltando a cair no T12 (Figura 7).

As células dos cães infectados produziram níveis maiores de IL-10 em relação aos vacinados. Os cães vacinados com a Leishmune[®] apresentaram diminuição dos níveis de IL-10 após a vacinação. Os cães da Leish-Tec[®] apresentaram um aumento em T1, mas depois os níveis diminuíram em T6 e se mantiveram baixos em T12 (Figura 7).

Quanto a produção de IL-6, dois cães do grupo de cães infectados produziram grandes quantidades de IL-6, porém a maioria dos animais (8) apresentaram níveis baixos dessa citocinas nas culturas de PBMC. Nos cães imunizados com a Leishmune[®] a produção se manteve baixa durante todos os tempos do estudo (T1, T6, T12). Nos cães da Leish-Tec[®] foi observado o aumento dos níveis em T1 e T6, mas em T12 os níveis caíram (Figura 7).

Figura 7: Quantificação de citocinas produzidas em culturas de PBMCs, após estímulo com extrato total de promastigotas de *L. infantum*, pela metodologia de Luminex, em cães imunizados com a Leishmune® (n=5), Leish-Tec® (n=6) e cães naturalmente infectados com doença leve (L) (n=4) e doença grave (G) (n=6).



IFN-g: interferon gama IL: Interleucina, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, T0: cães controle, T1: um mês após o protocolo vacinal, T6: seis meses após o protocolo vacinal, T12: um ano após o protocolo vacinal. L: Doença leve - cães com Leishmaniose visceral canina (LVC) com sinais clínicos leves, G: Doença grave - Cães com LVC com sinais clínicos graves. Para comparação entre os grupos controle 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%. # significativamente diferente de cães com doença leve, § significativamente diferente de cães com doença grave.

6 DISCUSSÃO

A utilização de vacinas é uma alternativa eficiente no controle das doenças infecciosas, no entanto o desenvolvimento de vacinas para leishmanioses é um desafio, devido as diferentes espécies de *Leishmania* spp envolvidas, da resposta imune envolvida para a indução de proteção, dificuldade na utilização de modelos experimentais adequados e da geração de uma memória imunológica permanente (DE LUCA, 2014; DE LUCA & MACEDO, 2016). Neste estudo foi comparado os padrões imunológicos de cães imunizados com diferentes vacinas (Leishmune® e Leish-Tec®) e com um grupo de cães naturalmente infectados.

Como método padrão de referência neste estudo, foi possível o isolamento parasitário em cultura de todos os cães naturalmente infectados, mas em dois deles (11,1%) não foi possível detectar o DNA do parasito através da qPCR. A qPCR é uma técnica altamente sensível e específica (MESQUITA, et al. 2001), porém a qualidade do material genético utilizado na reação pode interferir nos resultados (FERRER, et al. 2007). Neste estudo o material utilizado para extração de DNA foi a medula óssea que pode conter inibidores da reação de qPCR (DIETRICH, et al. 2013).

Foi observado que os cães com doença leve apresentaram menor carga parasitaria nas amostras de medula óssea (de 24,5 gEq) do que os cães com doença grave (5.137,07 gEq), demonstrando que a carga parasitaria pode influenciar na ocorrência de sinais clínicos, como descrito por outros autores (REIS, et al, 2006c; ABBEHUSEN, et al. 2017).

Em estudo de acompanhamento de até seis anos, entre cães experimentalmente infectados e naturalmente infectados, Abbehusen e colaboradores (2017) relataram semelhanças entre os grupos comparados até mesmo com a presença dos parasitos em linfonodo, pele e baço. Esses animais se mantiveram assintomáticos ou subclínicos por até seis anos, provavelmente pelo controle da resposta imunológica e também pelo fato de terem acompanhamento veterinário e nutricional adequados, além de serem de raça definida. O que difere do presente estudo onde a maior parte dos cães naturalmente infectados apresentaram sintomatologia grave, provavelmente pelo fato de viverem em área de recém-introdução da doença (MELLO, et al. 2014) viverem em área de baixa renda, provavelmente sem aporte nutricional e acompanhamento veterinário adequado.

Em estudos soropidemiológicos, o sexo geralmente não é estatisticamente associado com a infecção por *Leishmania* spp, e a diferença de frequência de infecção entre machos e fêmeas depende da área estudada (ABRANTES, et al. 2016; MALMASI, et al. 2014; MIRO, et al. 2017; BARBOSA, et al. 2015). Porém há indícios da influencia dos hormônios sexuais na imunidade podendo causar susceptibilidade ou resistência na infecção por *Leishmania* spp. Neste contexto, altos níveis de estrogênio e progesterona em fêmeas poderiam deixa – las mais susceptíveis (ROBERTS, et al. 2001). No presente estudo não foi observada a associação entre o sexo e a infecção, mas observamos que no grupo naturalmente infectado a maior parte dos cães eram machos (66,6%) e não castrados (100%). Este grupo de cães pode ser mais exposto ao risco de infecção devido a circulação em varias áreas da cidade a procura de fêmeas no cio.

As duas vacinas utilizadas neste estudo possuem em sua formulação a saponina como adjuvante, com o intuito de potencializar a resposta imune Th1 (PALATNIK DE SOUZA, et al 1996; FERNANDES, et al 2008). As saponinas são glicosídeos e parecem ter alta capacidade de induzir a produção de citocinas, porém podem causar atividade hemolítica e reações locais, provocando reações adversas (MOTA, et al 2006).

No presente estudo nenhuma reação adversa foi observada nos cães imunizados, provavelmente devido a boa condição imunológica dos animais e/ou por se tratarem de raças de porte médio a grande, pois raças de pequeno porte são mais sensíveis à dor no local da aplicação (bula Leishmune®). Testasica e colaboradores (2014) também não observaram efeito adverso significativo em animais imunizados com a Leish-Tec®. Fernandes e colaboradores (2014) observaram reações adversas em um (2,2%) cão imunizado com a Leishmune®, como dor, edema e formação de nódulo após a vacina e em seis (13%) cães imunizados com a Leish-Tec®, como apatia, hiporexia, anorexia, dor, edema, claudicação e nódulo. Estes cães eram provenientes de área endêmica, de diferentes raças, sexos e idades.

Em uma revisão sistemática sobre os fatores de risco associados a LV, Belo e colaboradores (2013) relataram que os cães de raça definida podem ser mais susceptíveis a doença, porém faltam informações na literatura referentes as características imunológicas entre cães com e sem raça definida. No presente estudo, foram vacinados cães de diferentes raças e não foram detectadas diferenças estatisticamente significante.

Um cão soroconverteu no DPP LVC após seis meses do protocolo vacinal com a Leish-Tec®, porém nos exames confirmatórios (ELISA, qPCR e cultura parasitológica) o

resultado foi negativo. Após um ano, o DPP LVC deste mesmo cão, foi negativo e todos os outros testes se mantiveram negativos.

Embora as duas vacinas testadas utilizem antígenos purificados ou recombinantes diferentes daqueles que compõem o DPP LVC e ELISA, casos de falso positivos podem ocorrer devido à reação cruzada com outros tripanosomatídeos em testes sorológicos (ALVES, et al. 2012). Estudos anteriores ao nosso demonstraram graus mais elevados de positividade aos testes do Ministério da Saúde (MARCONDES, et al. 2013; SOLCÀ, et al. 2015), porém, a maior taxa de soroconversão foi sempre verificada no ELISA, formulado com antígeno total de promastigotas de *L. major*, que por ser um extrato bruto pode conter os antígenos vacinais, o que pode justificar esses achados. Por outro lado, a taxa de soroconversão do DPP- LVC foi sempre baixa nesses estudos, o que corrobora nossos resultados.

Como o DPP- LVC utiliza antígeno recombinante diferente dos que compõem as duas vacinas, um resultado positivo pode decorrer de uma reação cruzada com outros tripanosomatídeos ou por uma infecção natural por *Leishmania* spp, relacionada com uma possível falha na indução de imunidade pela vacina (TESTASICCA, et al. 2014). Porém, no presente estudo, não foi possível fazer essa associação já que os cães vacinados não eram de área endêmica e foram negativos na cultura parasitológica de tripanosomatídeos.

Estudos mostraram sensibilidade e especificidade do DPP LVC de aproximadamente 87,5% e 73,3% respectivamente (SCHUBACH, et al. 2014), e que desde que o DPP LVC e ELISA foram implementados na rotina diagnóstica houve uma melhora no diagnóstico da LVC (SILVA, et al. 2013; SCHUBACH, et al. 2014).

Foi possível observar que mesmo em diferentes tempos de avaliação, cães vacinados contra LVC, independentemente da vacina utilizada, não soroconverteram no protocolo utilizado pelo MS (DPP- LVC/ELISA), o que permite afirmar que, na população avaliada, nenhum cão seria eutanasiado erroneamente. Além disso, o protocolo utilizado diagnosticou os verdadeiros infectados.

Quanto a resposta humoral frente às proteínas vacinais, foi observado que os cães imunizados com a Leish-Tec® ou Leishmune® apresentaram títulos maiores de anticorpos IgG total anti-A2 e FML, respectivamente, após a vacinação e esse aumento se manteve até o T12. Esse aumento se dá pela subclasse IgG2 que também aumentou após a vacinação e se manteve até 12 meses. Resultado semelhante foi relatado por diferentes autores que também

observaram aumento dos níveis de IgG2 anti-A2 nos cães vacinados com a Leish-Tec® (FERNANDES, et al. 2008; GRIMALDI, et al. 2017), assim como outros autores observaram os mesmos achados nos cães imunizados com a Leishmune® (AMORIN, et al. 2010; MENDES, et al. 2003) demonstrando indução da resposta humoral da vacina e aumento dos níveis de IgG2 que é desejável em uma vacina efetiva (REIS, et al. 2010), uma vez que a subclasse IgG2 está associada com a resposta Th1 e a resposta protetora a infecção por *Leishmania* sp (ROSTAMIAN, et al. 2017).

No presente estudo foi observado que os cães naturalmente infectados apresentaram taxas maiores de anticorpos anti- *L. infantum* do que os cães vacinados (Leish-Tec® e Leishmune®), ou seja, os cães vacinados reconhecem as proteínas vacinais no antígeno total de *L. infantum*, mas devido a baixa concentração de FML e A2 dificulta o reconhecimento. Porém cães naturalmente infectados responderam em maior nível ao FML e em menor nível a A2. A positividade para as proteínas vacinais por animais infectados ocorre devido as proteínas vacinais estarem presentes nas diversas espécies de *Leishmania* spp sendo capazes de desencadear uma resposta humoral específica nos cães doentes. Além disso, sabe-se que as mesmas proteínas vacinais podem ser utilizadas no diagnóstico sorológico de leishmaniose (CABRERA, et al. 1999; GHEDIN, et al. 1997).

Cães com LV parecem apresentar maiores taxas de todas as subclasses de IgG, principalmente IgG1, IgG3 e IgG4 (QUINNELL, et al. 2003). Lima e colaboradores (2017) associaram aumento de IgG1 com a susceptibilidade a LVC.

A avaliação da classe de anticorpo IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2), parecem não diferenciar animais vacinados de infectados e sinais de progressão da doença, visto que na literatura os achados são discordantes (FERNANDES, et al. 2014; REIS et al. 2006a; AMORIN, et al. 2010). A heterogeneidade genética dos cães e o momento da infecção podem influenciar nas titulações de anticorpos (FERNANDES, et al. 2008) assim como a também a utilização de anticorpos policlonais nas reações de ELISA (DAY, 2007).

No presente estudo, foi demonstrado que na resposta humoral específica (IgG total) aos antígenos vacinais, todos os cães (100%) vacinados com a Leishmune® apresentaram resposta vacinal ao FML, e pelo menos 91,7% dos vacinados com a Leish-Tec® responderam a proteína A2, indicando indução de resposta humoral específica após a vacinação.

Nogueira e colaboradores (2005) observaram a soropositividade de 100% dos cães imunizados com a Leishmune® por até 11 meses. Em um estudo realizado com cães de área

endêmica, Borja-Cabrera e colaboradores (2008) relataram 98% de soroconversão ao FML após o protocolo vacinal, onde os títulos de anticorpos permaneceram positivos até 12 meses após a vacinação com Leishmune®. Em outro estudo, De Lima e colaboradores (2010) observaram 100% de resposta humoral positiva para o antígeno de *Leishmania* spp e ao FML.

Testasica e colaboradores (2014) observaram positividade a A2 em 98% dos animais imunizados a campo com a Leish-Tec®, este valor diminuiu para 81% em 6 meses e dois meses depois do reforço vacinal retornou para o percentual 98 % dos animais. Nestes estudos de resposta humoral foram utilizados cães a campo de áreas endêmicas, por isso, esses cães podem ter entrado em contato com o parasito e reagido imunologicamente. No estudo aqui apresentado, os cães vacinados não eram de área endêmica e provavelmente não tinham contato com o parasito. Desta forma, a positividade aqui relatada somente se deu pelo estímulo vacinal.

Quanto ao resultado da imunofenotipagem foi observado que os cães infectados apresentam maior percentual de células TCD3⁺CD8⁺ em comparação com os animais controle (T0) e vacinados, o que sugere uma maior resposta imunológica nestes cães, produzindo maior número de células citotóxicas para controle da infecção. Mas é interessante verificar que, no grupo de cães infectados, apesar do aumento nos percentuais de células TCD3⁺CD8⁺ a maioria destas células não expressam o marcador CD25 (ativação), o que sugere que a ativação dos linfócitos CD8⁺ presentes no sangue periférico dos animais infectados e sintomáticos não esta sendo efetiva, portanto não controlando a infecção.

No presente estudo os cães com doença leve apresentaram percentagem maior de células TCD8⁺ em relação aos cães com doença grave, e apresentaram menor carga parasitaria na qPCR. O que corrobora com estudos anteriores que detectaram aumento no nível de TCD8⁺ em cães infectados com baixo parasitismo, pela citologia, no baço (GUERRA, et al. 2009), na medula óssea e em cães assintomáticos (REIS, et al. 2006b). Damosntrando que as células TCD8 tem papel importante na resistencia a *L. infantum*.

Borja Cabrera e colaboradores (2008) observaram um aumento na porcentagem de linfócitos (TCD8) em cães vacinados com a Leishmune® quando comparados com cães não vacinados (controle), embora no estudo os cães fossem de uma área endêmica, ou seja, estes cães poderiam ter entrado em contato com o parasito. Neste estudo, utilizando animais vacinados não expostos ao parasito, não observamos diferenças na percentagem entre os cães controle e vacinados, seja com a Leishume® ou com a Leish-Tec®.

Os percentuais de linfócitos TCD3⁺CD8⁺ e TCD3⁺CD4⁺ expressando o marcador de ativação CD25 mostraram uma tendência ao aumento após a imunização nos dois grupos estudados (Leishmune® e Leish-Tec®), principalmente no T12. Em um estudo, incluindo um número maior de cães talvez fosse possível detectar diferenças estatísticas significativas.

Os linfócitos TCD3⁺CD4⁺ não apresentaram amplas diferenças entre os grupos estudados. Em estudo anterior com a Leishmune®, também não foram observadas diferenças na porcentagem de linfócitos TCD4 quando comparados com cães não vacinados (BORJA CABRERA, et al, 2008). Resende e colaboradores (2008) observaram um aumento nos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺, em camundongos imunizados com epítomos específicos da proteína A2.

De Lima e colaboradores (2010) não observaram diferenças entre as taxas de linfócitos TCD8⁺CD25⁺ antes e após a vacinação, mas relataram diminuição de linfócitos TCD4⁺CD25⁺ em cães vacinados com a Leishmune®, provavelmente relacionado à proteção pós vacinal, já que esta população tem atividade regulatória produzindo citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF-β (DE LIMA, et al. 2010) o que poderia suprimir a resposta vacinal, porém neste estudo não foi realizada a marcação com o FoxP3.

No presente estudo, não foi observada diferenças nos percentuais de TCD3⁺CD4⁺CD25⁺ após a vacinação, mas foram observados níveis menores desse fenótipo celular em cães naturalmente infectados em comparação com os cães controle e vacinados. O que sugere que estas células (CD4) também não estavam ativadas nestes cães.

Além de ser um receptor para a IL-2, o marcador CD25 é também utilizado como marcador para celular T regulatórias (Tregs) quando associado ao FoxP3. Acredita se que essas células atuem suprimindo a resposta imune pró-inflamatória e controlando linfócitos T auto reativos (SAKAGUCHI, et al. 2008). Essas células desempenham importante papel na resposta imune exacerbada (BELKAID, 2003). Porém não podemos afirmar que as células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺ do presente estudo são Tregs, pois não foi possível avaliar o Foxp3, que é principal marcador de células Tregs (BELKAID, 2003).

Os cães imunizados com a vacina Leishmune® ou Leish-Tec® apresentaram uma leve queda nas proporções de linfócitos B CD21⁺ no sangue periférico em comparação com os cães controle (T0), porém essa proporção é maior quando comparados aos cães infectados, principalmente com doença leve, ou seja, os cães infectados apresentaram menor percentual de linfócitos B no sangue periférico. Durante o processo de diferenciação em plasmócito e sua

migração para a medula óssea, os linfócitos B maduros perdem a expressão de alguns marcadores (TARLINTON, et al. 2008) e passam a expressar outros marcadores (ABBAS, 2008). Como na LVC existe uma produção elevada de anticorpos, essa diminuição na marcação de CD21, nos cães infectados, pode estar intimamente relacionada com a hiperativação de linfócitos B e diferenciação em plasmócitos, o que corrobora com estudo de Reis e colaboradores (2006c) que observaram uma menor frequência de linfócitos B em cães com LVC em estado grave.

Diferente do presente estudo, Borja Cabrera e colaboradores (2008) descreveram um aumento na porcentagem de CD21 em cães vacinados com a Leishmune® em comparação com o grupo não vacinado, mas os cães eram de área endêmica para LVC, podendo a resposta celular ter sido induzida pelo parasito e não somente pela vacina.

O papel da reposta imune pode ser decisivo para a resistência a *Leishmania*. A reposta dependente de células Th1 específicas e citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α desempenham essa função (PINELLI, et al. 1994 PORTELA, et al., 2017). Porém, na infecção, é observado um balanço entre a reposta Th1 e Th2, com produção de citocinas pró e anti inflamatórias (SANTOS GOMES, et al. 2002).

Neste estudo foi observado que os cães imunizados com a Leishmune® após desafio *in vitro* com LiAg produziram maiores níveis de IFN- γ após um mês da vacinação e baixos níveis de IL-10, até seis meses pós vacinação. Os níveis de IL-8, TNF- α e IL-6 foram indetectáveis ou não tendem a aumentar após a vacinação. No caso do grupo de cães imunizados com a Leish-Tec® observamos, uma tendência ao aumento dos níveis de IFN- γ por volta do T6 e IL-8 e IL-6 até 6 meses pós vacinação, baixos níveis de IL-10 após 6 meses e 12 meses do término do protocolo vacinal e níveis baixos de produção de TNF- α .

O IFN- γ é uma das principais citocinas envolvidas no desenvolvimento de uma resposta Th1, associada com o combate e resistência ao parasito (TEIXEIRA, et al. 2006). O que é um efeito desejável e que indica que ambas as vacinas induziriam uma resposta Th1, porém a proteção seria até 6 meses onde os níveis de IFN- γ tiveram diminuição.

Os cães naturalmente infectados produziram níveis maiores de todas as citocinas avaliadas do que os cães do grupo controle e dos grupos imunizados, exceto pela produção de IFN- γ . Não foi detectada a produção de IL-6 nesse grupo, com exceção de dois animais, que apresentavam sinais clínicos leve da doença. A ausência de produção de IFN- γ pelas células dos cães com LVC ativa indica a incapacidade desses animais de combaterem a infecção, o

que corrobora com as manifestações clínicas apresentadas em sua maioria grave. Além disso, os níveis de IL-10 foram maiores nos cães doentes do que nos grupos vacinados e controle. Lage e colaboradores (2007) relataram altos níveis de IL-10 no baço de cães infectados em comparação com cães não infectados, correlacionando os níveis de expressão da IL-10 com a progressão da doença, e no mesmo estudo relacionam o aumento de IFN- γ com o aumento da carga parasitária no baço de cães doentes.

Os níveis de IFN- γ foram maiores no grupo de cães vacinados com Leishmune® do que no grupo Leish-Tec®. Costa-Pereira e colaboradores (2015) relataram aumento de IFN- γ em PBMC pela técnica de ELISA após um até seis meses da imunização com a Leishmune®, tendo retornado a níveis basais 12 meses após a imunização. Além disso, os mesmos autores relataram menores níveis de IL-10 após imunização com a Leishmune® em comparação com cães não vacinados (COSTA-PEREIRA, et al. 2015). De modo semelhante, no presente estudo os níveis de IL-10 dos cães imunizados com a Leishmune® diminuíram de forma significativa no T1 em comparação ao grupo não imunizado, voltando a aumentar em T12. Mas de forma distinta, os níveis de IFN- γ permaneceram altos 12 meses após a imunização com a Leishmune® (T12) em comparação ao primeiro mês (T1). Essa diferença no perfil de IFN- γ e IL-10 provavelmente está relacionada com o tipo de antígeno (antígeno solúvel de promastigotas de *L. infantum*) assim como a utilização de sangue total, população avaliada e o tempo de cultura utilizado para a avaliação das citocinas naquele trabalho.

No grupo de cães vacinados com a Leish-Tec® foi observado discreto aumento na produção de IFN- γ . Por outro lado, os níveis de IL-10 tendem a aumentar 1 mês após a vacinação (T1) e diminuem significativamente no T12. Em um estudo semelhante Fernandes e colaboradores (2008) observaram aumento de IFN- γ e IL-10 pela técnica de ELISA em sobrenadante de PBMC de cães vacinados com a Leish-Tec®, porém essa avaliação foi feita sete meses após desafio *in vivo* com *L. infantum*.

Os níveis de IL-8 também foram maiores nos cães infectados. Entre o grupo de cães vacinados, os imunizados pela Leish-Tec® apresentaram aumento dos níveis em T1, diminuição em T6 e níveis quase nulos em T12. Nos cães da Leishmune® a produção de IL-8 nos sobrenadantes das culturas de PBMC foi extremamente baixa ou ausente durante todo o período do estudo. Utilizando sangue total de cães imunizados com a Leishmune® estimulado com antígeno solúvel de *L. infantum*, Costa-Pereira e colaboradores (2015) relataram aumento da IL-8 pela técnica de ELISA 6 meses após a imunização, porém, esses níveis retornavam a

níveis basais após um ano de aplicação da vacina. A IL-8 é uma importante citocina pró-inflamatória da resposta imune inata que faz papel quimiotático, atraindo neutrófilos para o local da infecção (YOSHIMUYRA, et al. 1987), o aumento desta citocina nos cães infectados pode ser uma tentativa da resposta imune inata de controlar a infecção, assim como, nos cães vacinados de uma indução deste tipo de resposta celular.

No que se refere a produção de TNF- α , novamente os níveis mais elevados foram detectados nos sobrenadantes de PBMC dos cães infectados. Michelin e colaboradores (2011) observaram níveis maiores de TNF- α em fígado de cães com sinais clínicos para LVC quando comparado com cães sem sinais clínicos e saudáveis, sugerindo que esta citocina poderia ser um indicador no processo de progressão da doença. Não foi detectado diferenças na produção de TNF- α entre os grupos vacinados, porém após um ano da imunização com Leish-Tec® os animais apresentavam níveis de TNF- α inferiores aos controles (T0).

A produção de IL-6 foi praticamente ausente no grupo de cães infectados (LVC), com exceção de dois cães em que sua produção foi elevada. Coincidentemente esses dois cães possuíam sinais clínicos leve da doença do que os demais, como por exemplo, linfonodomegalia e esplenomegalia isolados.

A IL-6 pode ser um bom marcador para a doença ativa na LVC (LIMA, 2007). Vasconcelos et al (2016), relatam em um cão com LVC sem sinais clínicos, altos níveis de IL-6 no linfonodo pelo RT-qPCR e carga parasitária média, o que corrobora com nossos resultados. A produção dessa citocina tende a aumentar um e seis meses após a vacinação (T1 e T6) com Leish-Tec®, retornando a níveis semelhantes ao controle no T12.

Abbehusen e colaboradores (2017) observaram que em cães infectados experimentalmente ou naturalmente apresentaram menores níveis de TNF, IL-2 e IL-8 e maiores taxas de IL-10, IL-18, IL-6 e IFN- γ , quando comparados com cães saudáveis, o que corrobora em partes com nossos resultados, demonstrando que na infecção pelo parasito ou indução vacinal existe produção de variadas citocinas pró e anti-inflamatórias.

Essa é a primeira vez que um grupo de animais de área não endêmica e com raças variadas é avaliado em diferentes tempos após a vacinação, tendo suas respostas imunológicas comparadas entre si (Leish-Tec® X Leishmune®) e com um grupo de animais naturalmente infectados. Os demais estudos utilizaram grupos de animais de uma única raça como Beagles (FERNANDES, et al. 2008) ou de áreas endêmicas (COSTA-PEREIRA, et al. 2015), o que pode contribuir para introdução de vieses nas avaliações realizadas, como a possibilidade de

contato com o parasito em área endêmica. Vale ressaltar que no presente estudo os animais foram negativos na cultura parasitológica para tripanosomatídeos e monitorados durante todo o estudo com relação aos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde brasileiro para o diagnóstico da LVC e nenhum animal apresentou avaliação positiva (CAMPOS, et al 2017a). Dessa forma, temos maior segurança em afirmar que as respostas imunológicas observadas nos animais vacinados foram induzidas e mantidas pelas vacinas.

Muitas das áreas endêmicas de LVC são locais de baixa renda (BELO, et al. 2013) em que os animais possuem nutrição prejudicada. A exposição ao parasito nessas condições e com uma variabilidade genética alta pode ser determinante para a resistência ou susceptibilidade a *Leishmania* (TRAVI, et al. 2009; VASCONCELOS, et al. 2017). Os cães infectados do presente estudo são representativos desta casuística. Além disso, no Brasil, temos a dificuldade de acompanhar cães naturalmente infectados e descrever os padrões imunológicos que determinam a resistência e progressão da LVC devido ao fato de muitos viverem na erradicidade e ao medo dos tutores de terem os animais positivos para LVC apreendidos e submetidos à eutanásia.

No caso da leishmaniose canina, a vacina ideal deveria induzir uma resposta imunológica celular, ser forte e duradoura para controlar a progressão da doença e proteger toda uma população exposta (REIS, et al. 2010). Além disso, é desejável que diminua a carga parasitaria para que não ocorra a transmissão.

Uma das limitações do estudo foi o número de cães avaliados e a impossibilidade de acompanhamento de um grupo de cães infectados, porém estudos vacinais têm custos elevados já que requerem grande número de cães e existe a dificuldade no acompanhamento dos animais (GRADONI, 2015). Além disso, trabalhar com amostras biológicas pode ser um desafio no momento da coleta e armazenamento. O presente estudo poderá servir como fonte de informações imunológicas a respeito da vacinação anti LVC no Brasil, além disso, trata se de um estudo independente sem patrocínio da indústria.

No conjunto, nossos resultados demonstraram que cães imunizados Leishmune® ou Leish-Tec® apresentaram resposta imunológica semelhante. As vacinas foram capazes de induzir resposta humoral (IgG total e IgG2) por até 12 meses após a imunização. Ambas as vacinas foram pouco indutoras da resposta imune celular (Linfócito T (CD4 e CD8) e B), não tendo sido observadas diferenças estatísticas na avaliação celular “*ex vivo*” após a vacinação.

Após o desafio *in vitro* com LiAg as células produziram citocinas pró inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-8) em diferentes quantidades e baixos níveis de IL-10.

As vacinas estudadas protegem apenas uma parte da população onde é aplicada (DA SILVA, et al. 2001; BORJA-CABRERA, et al. 2002; FERNANDES, et al. 2014; GRIMALDI, et al. 2017) e neste estudo não atenderam completamente os requisitos imunológicos (resposta celular e produção de citocinas) que se espera para sua utilização como controle da LV. Além disso, após um período de 12 meses do protocolo de imunização (T12) com as duas vacinas, a produção de citocinas retornou aos níveis basais (T0 controles sadios), indicando a necessidade de reforço vacinal em um período inferior a 12 meses.

Neste cenário de incertezas e expansão da LVC, onde uma vacina poderia induzir um falso positivo em um exame sorológico ou ainda deixar de proteger uma parte da população exposta e ainda a possibilidade de selecionar cepas mais virulentas (MACKINNON, et al. 2008; GRIMALDI, et al. 2017) cabe avaliar se o uso de vacinas anti-LVC em saúde pública é eficaz e como seu uso rotineiros nas clínicas veterinárias impactará no controle da LVC.

7 CONCLUSÕES

- Não foram observadas reações adversas clínicas nos cães vacinados.
- Os cães vacinados, seja com Leishmune® ou Leish-Tec®, não soroconverteram, ao mesmo tempo, no DPP-LVC e ELISA do Ministério da Saúde.
- As vacinas Leish-Tec® e Leishmune® foram capazes de induzir resposta humoral específicas as proteínas vacinais (A2 e FML) por até 12 meses.
- Os cães imunizados sejam com a Leishmune® ou com a Leish-Tec® podem reconhecer as proteínas vacinais no antígeno total de *L. infantum*. E soro de cães com LVC podem reconhecer as proteínas vacinais A2 e FML.
- Os cães imunizados com a Leish-Tec® ou Leishmune® não apresentaram diferenças significativas nos perfis de Linfócitos T, T ativado e Linfócitos B após a vacinação. Cães com LVC apresentaram um aumento no número de células CD8⁺ no sangue periférico, porém essas células não parecem ser células ativadas, visto que esses mesmos animais apresentam níveis baixos de células T CD8⁺CD25⁺.
- Os cães imunizados com a Leishmune® ou Leish-Tec® após desafio *in vitro* com LiAg, produziram citocinas pró inflamatórias e baixos níveis de IL-10.
- Os cães naturalmente infectados após desafio *in vitro* não produziram IFN- γ , importante citocina da resposta Th1. E apresentaram altos níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória.
- O padrão de resposta imunológica celular ou humoral foi semelhante nos cães vacinados com a Leishmune® ou Leish-Tec®, entretanto, não há indícios suficientes, até o momento, para o uso das vacinas como controle da leishmaniose visceral, sendo necessários estudos com cães de áreas não endêmicas, com as vacinas estudadas e novas proteínas vacinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABBEHUSEN, M.M.C.; ALMEIDA, V.D.A.; SOLCÀ, M.D.S. et al. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Sci. Rep.**, v. 7, n.1, 2017.

ABRANTES, T.R.; MADEIRA, M.F.; SILVA, D.A. et al. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. **Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 58, n.3, 2016.

AGUIAR-SOARES, R.D.; ROATT, B.M.; KER, H.G. et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit. Vectors.**, v.7, p.61, 2014.

ALMEIDA, M.A; JESUS, E.E.; SOUSA-ATTA, M.L. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 127, n.3-4, p.227-232, 2005.

ALVES, A.S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F.B. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Res. Vet. Sci.** v.93, n.3, p.1329-33, 2012.

AMORIM, I.F.; FREITAS, E.; ALVES, C.F. et al. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Vet Parasitol.** v.173, n.1-2, p.55-63, 2010.

ARRUDA, M.M, FIGUEIREDO, F.B.; MARCELINO, A.P. et al. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 111, n. 3, p. 168-73. 2016.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n.3, p. 251-5, 1995.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 329–337, 2006.

BARBOSA, I.L; CARLOTA, F.C.; ANDRADE-NETO, V.F. Seroepidemiological Survey of Canine Leishmania Infections from Peripheral Areas in Natal, Northeast Brazil. **Open. Microbiol. J.**, v. 9, p. 43-47, 2015.

BELINCHÓN-LORENZO, S.; INIESTA, V. PAREJO, J.C. et al. Detection of Leishmania infantum kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 18, n.192, p. 43-50, 2012.

BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 4. 2013.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v.188, n.10, p.1941-53, 1998.

BELKAID, Y. The role of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in Leishmania infection. **Expert Opin Biol Ther.** v.3, n.6, p.875-85, 2003.

BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.; MADEIRA, M.F. et al. Occurrence of Leishmania infantum and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitol. Res.**, 2016. doi: 10.1007/s00436-016-4987-4. Epub 2016 Mar 16.

BOGGIATTO P.M.; RAMER-TAIT, A.E.; METZ, K. et al. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clin. Vaccine Immunol.**, 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. 3277-84, 2002.

BORJA-CABRERA, G.P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E. et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, n.17-18, p. 2234-43, 2004.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.B.; NICO, D. et al. The Leishmune®'s Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid in immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. **Procedia in Vaccinol.**, v. 6, p. 64-73, 2012.

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

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA Minicircle Database. **Parasitology Today.**, v. 14, n.11, 1998.

CABRERA, G.P.; DA SILVA, V.O.; DA COSTA, R.T. et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v.61, n. 2, p.296-301, 1999.

CARDIM, M.F.M.; GUIRADO, M.M.; MARGARETH REGINA DIBO, M.R. et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Rev Saúde Pública.** v.50, n.48, 2016.

CAMPOS, M.P.; DE LUCA, P.M.; RENZETTI, A.R.S. et al. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Cienc. Rural**, v.47, p. 1-6, 2017a.

CAMPOS, M.P.; MADEIRA, M.F.; SILVA, D.A. et al. Accuracy of quantitative polymerase chain reaction in samples of frozen and paraffinembedded healthy skin for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.6, p.1443-1450, 2017b.

CAMPOS, M.P.; SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F. et al. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro. **Rev. Brasil. de Parasitol. Vet.**, v.22, p. 424-426, 2013.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.15, n.128(1-3), p.67-70, 2009.

CARVALHO, F.A.; CHAREST, H.; TAVARES, C.A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.43, n.4, p.289-95, 2002.

CHARREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental Gene Expression in *Leishmania donovani*: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage Specific Gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, n. 14, 1994.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.** v.5, n.11, p. 873-882. 2007.

CHOUIHI, E.; AMRI, F.; BOUSLIMI N. et al. Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses. **Pathol. Biol.**, v.57, p. 219-224, 2009.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (Org) **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2014.

COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 4, n. 40, p. 415-419, 2007.

COSTA-PEREIRA, C.; MOREIRA, M.L.; SOARES, R.P. et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.** v. 11, n92, 2015.

DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N. et al. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v.19, n.9-10, p.1082–1092, 2001.

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

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital.**, v.47, n. 1, p.75-87. 1955.

DE LIMA, V.M.; IKEDA, F.A.; ROSSI, C.N.; et al. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN- γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v. 135, n. 3-4, p. 296-302, 2010.

DE LIMA, V.M.F.; PEIRO, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.115, p.189–193, 2007.

DE LUCA, P.M. Vacinas nas leishmanioses. In: Conceição-Silva, F.; Alves, C.R (org.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 465-78.

DE LUCA, P.M.; MACEDO, A.B.B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Front. Immunol.**, v. 7, n. 151, 2016.

DIETRICH, D.; UHL, B.; SAILER, V. et al. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. **PLoS ONE**, v.8, n.10, 2013.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 2, p. 125-30, 1996.

FERNANDES, C.B.; MAGALHÃES JUNIOR, J.T.; DE JESUS, C. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnoses. **Vaccine**, v. 32, p.1287–1295, 2014

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**. v. 26, n.46, p. 5888-95, 2008.

FERREIRA, A.R.; SINGH, B.; CABRERA-MORA, M. et al. Evaluation of Naturally Acquired IgG Antibodies to a Chimeric and Non-Chimeric Recombinant Species of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein-1: Lack of Association with HLA-DRB1*/DQB1* in Malaria Exposed Individuals from the Brazilian Amazon. **PLoS ONE** 9(8): e105828. doi:10.1371/journal.pone.0105828, 2014.

FERRER, I.; ARMSTRONG, J.; CAPELLARI, S. et al. Effects of Formalin Fixation, Paraffin Embedding, and Time of Storage on DNA Preservation in Brain Tissue: A BrainNet Europe Study. **Brain Pathol.**, v.17, p.297–303, 2007.

FERROGLIO, E.; POGGI, M.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. **Zoonoses Public Health**, v. 55, n. 3, p. 145-8, 2008.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.137, p.214–221, 2006.

FRANÇA-SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; COSTA, R.T. et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.131, n.3-4, p. 213-220, 2005.

FREITAS, M.V. M.; BRUN, C.F.L.; RODRIGUES, M. C. et al. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.47, n. 10, 2017.

FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Rev. Port. Ciênc. Vet.** v.105, n.573-576, p. 11-20, 2010.

FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F; MENEZES, R.C. et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniosis. **Vet. J.** v.186, p.123-124, 2010.

FURLANETO, I.P.; SOUSA, E.B.; BRITO, M.L. et al. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. **Cad. Saúde Colet.**, v.15, n.3, p.401-404, 2007.

FURTADO, M.C.; MENEZES, R.C.; KIUPEL, M. et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Parasit. Vectors.**, v. 8, p.1-5, 2015.

GALATI, E.A.; NUNES, V.L.; REGO JUNIOR, F.A. et al. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ver. Saude Publica.**, v.31, n.4, p.378-90, 1997.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C. et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 1, n. 217, 1999

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v.123, p. 439-454 439, 2006.

GHEDIN, E.; WEIZHANG, H.; CHAREST, H. et al. Antibody Response against a *Leishmania donovani* Amastigote-Stage-Specific Protein in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4, n. 5, p. 530-5, 1997.

GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v.20, n.1-2, p.59-66, 2001.

GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, A.O. et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**. v.26, n.5, p.623-38, 2008.

GLENTING, J., WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, n.4, p.26, 2005.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Ver. Bra. Epidemiol.**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. **Vet. Parasitol.**, v.208, n.1-2, p.94-100, 2015.

GRIMALDI, G.; TESH, JR.R.B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, n.3, p.230-50, 1993.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C.B. et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec[®] vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**, v.12, n.9, p.e0185438, 2017.

GUERRA, L.; TEIXEIRA-CARVALHO, R.; GIUNCHETTI, A. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 104, n. 3, p. 611–622, 2009.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n.2, p. 229–243, 2001.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n.7, p. 1989-95, 1998.

HU, X.S.; YANG, W.T.; LU, H.G. et al. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.**, v.86, n. 4, p. 822-6, 2000.

IMAM, T.S. The complexities in the classification of protozoa: a challenge to parasitologists. **Bajopas.**, v.2, n.2, 2009.

JAURIGUE, J.A.; SEEBERGER, P.H. Parasite Carbohydrate Vaccines. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 7, n. 248, 2017.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Hum. Vaccin.**, v.7, n.11, p. 1204-1214, 2011.

KUHLS, K.; ALAM, M.Z.; CUPOLILLO, E. et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.5, n.6, 2011.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitol.**, v.125, n. 3, p.197-207, 2002.

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

LARA-SILVA, F.O.; MICHALSKY, É.M.; FORTES-DIAS, C.L. et al. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta. Trop.**, v. 176, n. 109-113, 2017.

LIMA, L.V.D.R.; CARNEIRO, L.A.; CAMPOS, M.B. et al. Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. *Parasite*. v.24, n.37, 2017.

LIMA, V.M.; PEIRO, J.R.; OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.115, n.1-2, p.189-93, 2007.

LOPES, M.F.; COSTA-DA-SILVA, A.C.; DOS REIS, G.A. Innate immunity to *Leishmania* infection: within phagocytes. **Mediators Inflamm.**, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/754965/>. Acesso em: Dez. 2017.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T. et al. Detection of *leishmania infantum* in DNA by real time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparasion with others diagnostics techniques. **Vet. Parasitol.**, v.18, p. 410-17, 2012.

MACKINNON, M.J.; GANDON, S.; READ, A.F. Virulence evolution in response to vaccination: The case of malaria. **Vaccine**, v.26 (Suppl 3) C42–C52. 2008.

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; PINTO, A.G. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res. Vet. Sci.**, v. 87, n. 2, p. 260-2, 2009.

MADEIRA, M.F.; M.A.; BARROS, J.H. et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology.**, v. 136, p. 411–423, 2009b.

MALMASI, A.; JANITABAR, S.; MOHEBALI, M. et al. Seroepidemiologic Survey of Canine Visceral Leishmaniasis in Tehran and Alborz Provinces of Iran. **J. Arthropod. Borne. Dis.**, v.8, n.2, p.132-8, 2014.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 251-62, 2004.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Vet. J.**, v. 182, n. 3, p. 441-5, 2009.

MARCONDES, M.; DE LIMA, V.M.; DE ARAÚJO, M.F. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune® canine. **Vet Parasitol.** v.197, n.3-4, p. 649-52, 2013.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saude Publica.**, 10 Suppl, v. 2, p. 359-75, 1994b.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 162-167, 1997.

MAYRINK, W.; DA COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A. et al. Field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.73, n.4, p.385-7, 1979.

MELLO, C.X.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES JUNIOR, A.A.V. et al. Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.47, n.6, 2014.

MENDES, C.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. **Vaccine**. v. 21, p. 2589–2597, 2003.

MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 15, n.4, p. 314-319, 2001.

MICHELIN, A. DE F.; PERRI, S.H.V.; DE LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.105, n.5, p.373–383, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Manual de Normas de Vacinação. 3.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001. 72p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual_Vigilancia_Control_Leishmaniose_Visceral.pdf>. Acesso em: julho 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Nota técnica conjunta nº 01/2011- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2015.pdf>. Acesso em: jul. 2016. Online.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Nota técnica - MAPA - nº 038/2014/ DFIP/DAS - **suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune vacina contra leishmanioses visceral canina**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Produtos%20Veterin%C3%A1rios/NOTA%20TECNICA%20DFIP%203814%20LEISHMUNE.pdf>. Acesso em: jul. 2016. Online.

MINISTÉRIO DA SAÚDE e MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO. **Nota de esclarecimento sobre as vacinas antileishmaniose visceral canina registrado no MAPA**. Brasília, 2009. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Registros_Atorizacoes/Produtos_veterinarios/Comunicacoes_e_instrucoes_tecnicas/Nota_de_esclarecimento%20sobre_a_vacina_...pdf>. Acesso em: jul. 2016. Online.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica - Vacina **Anti-Leishmaniose Visceral Canina: Leishmune®**. 2005. Disponível em: <portal.saude.gov.br/gov/arquivos/pdf/leishmune_nota_tecnica.pdf>. Acesso em: jul. 2016. Online.

MIRÓ, G.; MÜLLER, A.; MONTOYA, A. et al. Epidemiological role of dogs since the human leishmaniosis outbreak in Madrid. **Parasit. Vectors**. v.10, n. 209, 2017.

MITCHELL, G.F.; HANDMAN, E.; SPITHILL, T.W. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 62, p.145-53, 1984.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, 2007.

MOTA, E.F.; LIMA, M.G.S.; MELO, D.F. ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS: AVANÇOS E PERSPECTIVAS. **Cienc. Animal.**, v.16, n. 2, p.79-88, 2006.

MURRAY, Y.H.W.; LU, C.M.; MAUZES FREEMAN, N.S. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, v.70. p. 6284-6293, 2002.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **Int. Immunopharmacol.**, V.11, n. 10, p.1464-88, 2011.

NICO, D.; GOMES, D.C.; PALATNIK-DE-SOUSA, I. et al. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. **Front Immunol.**, v. 5, 2014.

NIETO, C.G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 67, n..2, p.117-30, 1999.

NOGUEIRA, F.S.; LISBOA, J.C.V.D.L. Zoonose avança no Estado de São Paulo Leishmaniose Visceral: a doença dos mais pobres dos pobres! **BOLETIN APAMVET** 2017. Disponível em: revistas.bvs-vet.org.br/apamvet/article/download/37428/42052. Acesso em: dez 2017.

NOGUEIRA, F. S., LISBOA, J.C.V. D. L, Zoonose avança no Estado de São Paulo: Leishmaniose Visceral: a doença dos mais pobres dos pobres. **BOLETIM Apamvet**, 2017.

NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.; BORJA-CABRERA, G.P. 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, p.4805-4810, 2005.

NUNES, V.L.; GALATI, E.A.; NUNES, D.B. et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n.3, p.299-300, 2001.

OGHUMU, S.O.; LEZAMA-DÁVILA, C.M.; ISAAC-MÁRQUEZ, A.P. et al. Role of Chemokines in Regulation of Immunity against Leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n.3, p. 389–396, 2010.

OLIVEIRA, V.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS One**, v. 12, p. e0175588, 2017.

OWENS, S.D.; OAKLEY, D.A.; MARRYOTT, K. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, n.8, p. 1076-83, 2001.

PALATNICK-DE-SOUZA, 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.; DOS SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA, J.C.; et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.5, p. 510-7, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. et al. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate gp63 is the major immunogen of the fucose mannose ligand (FML). **Acta Trop.**, v. 53, n. 1, p. 59-72, 1993.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; GOMES, E.M.; PARAGUAI DE SOUSA, E. et al. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the Fucose Mannose Ligand as an aid in diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 390-393, 1995.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; GOMES, E.M.; SOUZA, E.P. et al. The FML (Fucose Mannose Ligand) *Leishmania donovani*. A new tool in diagnosis, prognosis, transfusionul control and vaccination against human kala-azar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 29, p.153-163, 1996.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; GOMES, E.M. et al. Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the fucose mannose ligand (FML). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.27, p.547–51, 1994.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.; SANTOS, W.C. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, n.1, p. 39-44, 1996.

PINA TRENCH, F.J.; RITT, A.G.; GEWEHR, T.A. et al. First Report of Autochthonous Visceral Leishmaniosis in Humans in foz Do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Ann. Clin. Cytol. Pathol.** v. 2, n. 6, p. 1041, 2016.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infecti. immune.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PEREZ, T.D.; FIGUEIREDO, F.B.; JUNIOR, A.A. et al. Prevalence of american trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v.3, n.58, p.79, 2016.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A.M. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.49, n.3, p.364-9, 1993.

PORTELA, A.S.B.; COSTA, L.E.; SALLES, B.C.S.S. et al. Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. **Immunobiology.** 2017. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.043.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.91, n.3-4, p.161-8, 2003.

ROSTAMIAN, M.; SOHRABI, S.; KAVOSIFARD, H. et al. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. **J. Microbiol. Immunol. Infec.** v. 50, p.160-166, 2017.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.9, p. 2931-5, 1999.

REGINA-SILVA, S.; FERES, A.M.; FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v.34, n.19, p.2233-9, 2016.

REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C.; CARRILLO, E. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitol.**, v. 7, n. 26, p. 341–349, 2010.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical / hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res.Vet.Sci.**, v. 81, n.1, p. 68–75, 2006c.

REIS, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006b.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs

naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopat.**, v.112, p. 102-116, 2006a.

RESENDE, D.M.; CAETANO, B.; DUTRA, M. et al. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania amastigote* specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8⁺ T cells. **Vaccine**, v. 26, p. 4585 - 4593, 2008.

RESENDE, L.A.; AGUIAR-SOARES, R.D.; GAMA-KER, H. et al. Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after *Leishmania chagasi*-Challenge. **PLoS One**, v.11, n.8, p.e0161169, 2016.

REY, L. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2ª ed: Editora Guanabara Koogan AS, 1991.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P.G.; ALEXANDER, B. et al. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B.E.; BARKER, D.C. et al. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n. 2, p. 748-51, 2000.

RIBEIRO, R.A.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; BELO, V.S. et al. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and Leishmune(®)-vaccinated dogs. **Vet. Res. Commun.**, v.39, n.2, p. 87-95, 2015.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F. VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends Parasitol.**, v.5, n.11, p. 505-10, 2009.

RIVIER, D.; SHAH, R.; BOVAY, P.; et al. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. **Parasite Immunol.**, v.15, n.2, p.75-84, 1993.

RIVIER, D.; BOVAY, P.; SHAH, R. et al. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite Immunol.**, v.21, n.9, p.461-73, 1999

ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; COURA-VITAL W. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front. Immunol.**, n. 5, p. 272, 2014.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 3, p. 476–488, 2001.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br. Med. J.**, v.14, n. 2(2237), p.1261–1262, 1903.

ROURA, X.; FONDEVILA, D.; SANCHEZ, A. et al. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.11, n.4, p. 385-7, 1999.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v.133, n.5, p.775-87, 2008.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, n.1-2, p.21-30, 2002.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet.**, v.12, p.315-317, 1998.

SANTOS, W.R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; PALATNIK, M. et al. Vaccination with the FML antigen (fucose mannose ligand) of *Leishmania donovani* in the Swiss Albino model. **Vaccine**, v.17, p. 2554–61, 1999.

SARAIVA, E.M.; FIGUEIREDO BARBOSA, A.; SANTOS, F.N. et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**. v. 24, n.13, p.2423-31, 2006.

SCHUBACH, E.Y.; FIGUEIREDO, F.B.; ROMERO, G.A. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.108, n.9, p.568-74, 2014.

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n.5, p. 435-8, 2015.

SILVA, F.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.160, n.1-2, p. 55-9, 2009.

SHAHBAZIA, M.B.; ZAHEDIFARDB, F.; SALJOUGHIANB, N. et al. Immunological comparison of DNA vaccination using two delivery systems against canine leishmaniasis **Vet. Parasitol.**, v. 212, p.130–139, 2015.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X. 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. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 265–76, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit. Vectors.**, v.4, p,86, 2011.

SOLCÀ, M. S.; SOUZA, P.S.; GUEDES JUNIOR, J.C.O. et al. Avaliação dos testes sorológicos preconizados pelo ministério da saúde em cães vacinados contra leishmaniose visceral. **Rev. Educ. Cont. Vet. Med. e Zoot.**, v.12, n.3, p.58-58, 2015.

SOUZA, A.P.L.; JESUS, J.R.; TEIXEIRA, M.C. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v.11, n.2, jan. /jun. 2014.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasit. Vectors**, v. 9, p. 277, 2016.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C. et al. 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, p. 8427-8432, 2000.

TRAUB-CSEKO, Y.M.; DUBOISE, M.; BOUKAI, L.K. et al. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.57, p. 101–116, 1993.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods.**, v. 292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TARLINTON, D.; RADBRUCH, A.; HIEPE, F. et al. Plasma cell differentiation and survival. **Curr Opin. Immunol.**, v.20, n.2, p.162-9, 2008.

TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B. et al. **Trends Parasitol.** Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. v.22, n.1, p.32-40, 2006.

TESTASICCA, M.C.; DOS SANTOS, M.S.; MACHADO, L.M. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Vet. Parasitol.**, v.204, n.3-4, p.169-76, 2014.

TRAVI, B.L.; OSORIO, E.Y.; SALDARRIAGA, O.A. et al. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 6, p. 994–1003, 2009.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.164, n. 2-4, p.118-123, 2009.

VASCONCELOS, T.C.; DOYEN, N.; CAVAILLON, J.M. et al. Cytokine and iNOS profiles in lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their association with the parasitic DNA load and clinical and histopathological features. **Vet. Parasitol.**, v. 227, p.8-14, 2016.

VON ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. et al. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad. Saúde Pública.**, v. 32, n. 6, 2016.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev. Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WHO. World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. 2010. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_trs_949/en/. Acesso em: dez.2017.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2017. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em: dez 2017. Acesso em: dez. 2017.

YASUR-LANDAU, D.; JAFFE, C.L.; DAVID, L. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004341>. Acesso em: dez. 2017.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S. et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc Nat Acad Sci USA.**, v. 84, p.9233-9237, 1987.

ZHANG, W.W.; MENDEZ, S.; GHOSH, A. et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.37, p.35508–15, 2003.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Ficha clínica dos animais do estudo.

Data: _____ Registro: _____
Nome: _____ Raça: _____
Idade: _____ Sexo: _____ Pelagem _____
Vermifugado: _____ Vacinado: _____ Peso: _____
Temp: _____ Canil: _____

Exame clínico: _____
Estadogeral: _____
Pelagem: _____
Linfonodos: _____
Mucosas: _____
Palpação: _____
Escore corporal: _____
Lesões: _____
Outros: _____
Outras enfermidades: _____

Vacina: _____ Lote: _____
Resultado DPP T0: _____
Resultado DPP T1: _____
Resultado DPP T6: _____
Resultado DPP T12: _____
OBS: _____

Datas de coleta:

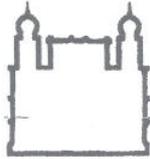
T0: _____ T1: _____

T6: _____ T12: _____

APÊNDICE 2: Artigo publicado pela revista Ciência Rural (ISSN 1678-4596)

ANEXOS

Anexo 1: Licença da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/IOC com o número L-45/2015



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 exime 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.

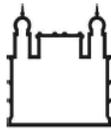
Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

Anexo 2: Licença da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/Fiocruz com o número
LW-4/17



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 PARASITARIA 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 exime 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

