



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**“DURAÇÃO DA IMUNIDADE VACINAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA: PADRÃO DE CITOCINAS SINTETIZADAS POR
LEUCÓCITOS CIRCULANTES APÓS ESTÍMULO *IN VITRO* COM
ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Leishmania chagasi*”**

Christiane Costa Pereira

**Belo Horizonte - MG
Fevereiro - 2013**

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**“DURAÇÃO DA IMUNIDADE VACINAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
PADRÃO DE CITOCINAS SINTETIZADAS POR LEUCÓCITOS CIRCULANTES
APÓS ESTIMULO *IN VITRO* COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA
CHAGASI*.”**

Christiane Costa Pereira

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de
Pesquisas René Rachou, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho - Laboratório de Biomarcadores de
Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas
René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

Co-orientador: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo - Laboratório de Biomarcadores de
Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas
René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

**Belo Horizonte - MG
Fevereiro – 2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P436d Pereira, Christiane Costa.
2013

Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral: padrão de citocinas sintetizadas por Leucócitos circulantes após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* / Christiane Costa Pereira. – Belo Horizonte, 2013.

xx, 77 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 87 - 97

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose Visceral canina/imunologia 2.
Leishmania chagasi/patogenicidade 3.
Citocinas/genética I. Título. II. Martins-Filho, Olindo Assis (Orientação). III. Araújo, Márcio Sobreira Silva

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

“DURAÇÃO DA IMUNIDADE VACINAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
PADRÃO DE CITOCINAS SINTETIZADAS POR LEUCÓCITOS CIRCULANTES
APÓS ESTIMULO *IN VITRO* COM ANTÍGENO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*
CHAGASI.”

Por

Christiane Costa Pereira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho CPqRR/FIOCRUZ (Orientador/Presidente)
Prof. Dr. Edward José de Oliveira CPqRR/FIOCRUZ (Titular)
Profa. Dra. Mariléia Chaves de Andrade UNIMONTES (Titular)
Profa. Dra. Erika Michalsky Monteiro CPqRR/FIOCRUZ (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em: 04/03/2013

Local de Desenvolvimento da Dissertação

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração

Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ / MG

Colaboradores

Marcela de Lima Moreira ^I

Bruno Henrique Marteleto ^I

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti ^{II}

Kelvinson Fernandes Viana ^{II}

Dr. Vitor Márcio Ribeiro ^{III}

I- Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ – MG – Belo Horizonte / MG

II- Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

III- Clínica Veterinária Santo Agostinho - Santo Agostinho - Belo Horizonte / MG

Suporte Financeiro

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais

FIOCRUZ / PAPES - Fundação Oswaldo Cruz/ Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou

Dedico este trabalho aos meus pais, Ário e Célia, que são exemplos de vida, força, coragem, caráter e sabedoria.

Aos meus irmãos Lucas e Marcos pelo companheirismo e amizade.

Ao Léo, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência e ansiedade.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!

Agradecimentos

“A Deus, acima de tudo e de todos, fonte infinita de sabedoria”.

Ao Dr. Olindo, pela orientação, ensinamentos transmitidos e por compartilhar comigo e com minha família momentos tão importantes, como meu casamento.

Ao meu amigo, professor e co-orientador Márcio Sobreira. Obrigada pela orientação, confiança, oportunidade e paciência. Sem você não conseguiria chegar até aqui! Essa conquista é nossa!

Aos meus pais, meus maiores orgulhos e minha inspiração, por terem feito tudo que estava ao alcance para me ajudar sempre, por me encaminharem na vida com tanto carinho, respeito e valores. Agradeço-os por me ensinarem, me corrigirem, me incentivarem, me acalmarem.

Especialmente ao meu pai, por ter acompanhado de perto meus experimentos altas horas da madrugada e minha mãe que ficava em casa esperando a gente voltar... Vocês são meu “Porto Seguro”!

Ao meu irmão Lucas, que me ajudou sempre que precisei, aliás, preciso dele sempre...obrigada por tudo irmão!

Ao meu irmão Marcos, amo muito você!

Ao Léo, pelo grande amor, paciência, dedicação e apoio constante! Obrigada por sempre me dizer nos momentos que eu mais precisei: “Não se preocupe, Deus está no comando!”.

À amiga Marcela, muito obrigada pela sua ajuda, companheirismo nas idas e vindas das clínicas veterinárias e especialmente pelos momentos de confiança que tivemos juntas. Você merece todo sucesso do mundo!

Ao Dr Rodolfo Giunchetti, pela colaboração, confiança, incentivo e sugestões apresentadas.

Ao Doutorando Kelvison, pelo apoio prestado durante o experimento e pela amizade que construímos.

À Carol, Fê e Dani: obrigada por aguentarem nossas conversas altas e discussões sobre nossa dissertação. Adoro vocês!

À Dra. Vanessa, sempre acolhedora, modelo de profissional. Gosto muito de você!

Ao Dr. Vítor e Mariana da Clínica Santo Agostinho, pela colaboração na conversa com os proprietários e coleta de amostras sempre que precisávamos.

Aos veterinários: Dr. Silvio (Clínica Buritis), Dra. Fernanda (Clínica Estimação), Dra. Fabrissa (Clínica Castelo dos Bichos) e Dra Daniela (Clínica Cão e CIA) que nos auxiliaram com tanto carinho na obtenção das amostras para os experimentos.

Aos meus familiares, em especial Vovó Isabel, Carla, Tia Lourdinha, Tia Bia e filhas por sempre torcerem por mim.

À amiga Renata Aline, com importantes conselhos e dicas. Vou levar pra sempre!

À todos os amigos do laboratório de Biomarcadores: Jojo, Tati(s), Marquito, Renatinha, Michele, Maísa, Cris Bidu, Mateus e especialmente Bruno Marteleto, meu amigo “sobreira”, que colaborou com vários cães para nosso trabalho. Vocês estão no meu coração!

Aos diretores do centro de pesquisa René Rachou, Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira e Dra. Zélia Profeta da Luz, pelo apoio e por terem me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, e aos professores.

Às colegas da Plataforma de citometria de fluxo, Tiza e Simone, pelos auxílio durante as leituras no “Facs”.

As minhas amigas e colegas do mestrado, Dani, Ana, e Amanda pela grande amizade e pela convivência animada durante aulas. Saudades!

As agências financiadoras: CNPq, FAPEMIG e ao Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ.

Sou eternamente grata a todas as pessoas que mesmo em sua mais breve passagem ou curta convivência me ofereceram sua contribuição, de qualquer natureza, para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	XII
Lista de Quadros	XIV
Fotografia e Diagrama	XV
Lista de Abreviaturas	XVI
Resumo	XIX
Abstract	XX
INTRODUÇÃO	21
Leishmanioses: conceito, ciclo biológico e epidemiologia	22
Resposta imunológica do hospedeiro	24
Tratamento, controle e vacinas contra leishmanioses	28
JUSTIFICATIVA	38
OBJETIVOS	41
1 - Objetivo Geral.....	42
2- Objetivos específicos.....	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
1. Animais	44
2- Amostras	46
3-Vacinas	46
4– Desenvolvimento de Protótipo do Kit para avaliar predição de proteção dos animais vacinados contra LVC	46

5 - Avaliação da Resposta Imune Celular.....	47
6 - Obtenção do Antígeno Solúvel de <i>Leishmania chagasi</i> (ASL) utilizado como estímulo dos leucócitos nas culturas de sangue total por 48 horas.....	48
6.1- Obtenção da massa de promastigotas.....	48
6.2 - Preparo do Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i> (ASL).....	48
7- Ensaio da imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas.....	49
8 - Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas de sangue total.....	51
9- Análise de citocinas secretadas por leucócitos periféricos por meio de Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).....	54
9.1- Quantificação de IL-8, TNF- α , IL-4, e IL-10.....	54
9.2- Quantificação de IFN- γ	55
10- Análise estatística dos dados.....	56
RESULTADOS.....	57
1 - Impacto da imunização com Leishmune[®] no perfil de síntese de citocinas em leucócitos do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>.....	58
1.1- Perfil de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	58
1.2- Análise da frequência cumulativa de cães apresentando diferentes níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>Leishmania chagasi</i>	60
1.3- Análise comparativa da assinatura de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>Leishmania chagasi</i>	61

1.4. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	67
1.5. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD4 ⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	68
1.6. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD8 ⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	70
DISCUSSÃO	72
EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Lista de Figuras

- Figura 1** - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺TNF- α ⁺ e TCD8⁺IL-4⁺ na cultura de sangue total de cães não vacinados e imunizados com a Leishmune[®]53
- Figura 2** - Perfil de citocinas secretadas por leucócitos do sangue periférico de cães após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....59
- Figura 3** - Frequência cumulativa de cães apresentando diferentes níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania chagasi*.....61
- Figura 4 A** -Ponto de corte para citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....63
- Figura 4 B**- Diagramas para cálculo da frequência de cães com altos níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....63
- Figura 5** – Assinatura de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....65
- Figura 6** - Análise comparativa das assinaturas de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....66
- Figura 7**- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune[®] após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*68
- Figura 8**- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune[®] após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*69

Figura 9- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.....71

Lista de Quadros

Quadro 1 - Composição dos grupos (T0, T1, T6 e T12).....45

Quadro 2 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas *in vitro*.....51

Fotografia e Diagrama

Diagrama 1- Desenho experimental – *avaliação da resposta imune celular*.....45

Fotografia 1 – (A) Tubo com cultura de sangue total após 48 horas de cultivo sob estímulo, anterior a centrifugação - (B) Tubo com cultura de sangue total após 48 horas de cultivo sob estímulo, posterior a centrifugação.....47

Lista de Abreviaturas

Ac	Anticorpo
ADP	Adenosina difosfato
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
°C	Graus Celsius
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares / indutores
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos / supressores
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CMF	Canal Médio de Fluorescência
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CP	Proteína Cisteína
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DCs	Células dendríticas
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FL1	Fluorescência do tipo 1
FL2	Fluorescência do tipo 2
FML	Fucose Manose Ligante
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
IDR	Intradermorreação
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
LACEN	Laboratórios centrais

LB	Linfócitos B
LIT	Meio de cultura de Infusão de fígado e Triptose
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarídeo
LT	Linfócitos T
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAC	Complexo de ataque a membrana
MCP	Proteína Quimiotática para monócitos
MFF	Solução fixadora
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
ND	Não detectáveis
NNN/LIT	Meio de cultivo bifásico Nicole, Novy e Neal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial Hidrogênionico
PMA	Acetato mirístico de forbol
PPG	Proteofosfoglicano
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
T0	Grupo controle- cães não vacinados
T1	Grupo de cães 1 mês após vacinação
T6	Grupo de cães 6 meses após vacinação

T12	Grupo de cães 12 meses após vacinação
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Células T helper
Th1	Celulas T CD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Celulas T CD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	Organização Mundial da Saúde
μ L	microlitro

Resumo

A leishmaniose visceral é endêmica em muitas regiões do Brasil e é uma importante doença infecto-parasitária causada por protozoários. Além dos seres humanos, os cães também são seriamente acometidos e, no meio urbano, são considerados os principais reservatórios da doença. Esta espécie animal caracteriza-se como fonte de transmissão eficaz por coabitar com as pessoas e, muitas vezes, apresentar altas taxas de infecção sem ter um quadro clínico aparente. A atual estratégia para o controle desta doença é baseada na eliminação de cães soropositivos, tratamento sistemático dos casos humanos e o controle vetorial. Embora a eutanásia do cão seja a principal estratégia de controle da doença, não é amplamente aceita, especialmente por parte dos proprietários. Contudo, as estratégias terapêuticas mais estudadas em cães não conseguiram alcançar a cura parasitológica consistente em CVL. Neste contexto, o desenvolvimento de uma vacina protetora contra CVL poderia ser uma ferramenta promissora para o controle de CVL e conseqüentemente para Leishmaniose visceral humana. Normalmente, há um consenso de que o microambiente citocina desempenha um papel central no resultado da patogênese da leishmaniose. O principal mecanismo efetor envolvido na resposta imunoprotetora em cães infectados com *Leishmania* é a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ , levando-o a eliminar a forma amastigota intracelular mediada pela produção de óxido nítrico. O objetivo do nosso estudo foi avaliar o perfil de citocinas em cães, em diferentes tempos pós vacinação com Leishmune[®], após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. Empregamos citometria de fluxo e ELISA para análise da produção de citocinas intracelular e secretadas, respectivamente. Os nossos resultados mostraram que a Leishmune[®] foi capaz de induzir um aumento do nível de produção de IL-8 e IFN- γ , IL-17a e TNF- α e redução de IL-10 no primeiro e sexto mês após a vacinação, e também redução de IL-4 seis meses após vacinação. No grupo de cães com um ano após vacinação, não foi encontrada nenhuma alteração significativa em relação ao perfil de citocinas do grupo de cães não vacinados. As alterações imunológicas acima citadas, levam-nos a acreditar que o processo vacinal promove o desenvolvimento de um perfil de resposta imune celular capaz de induzir imunoproteção aos cães vacinados, ou seja, o animal desenvolve mecanismos imunobiológicos supostamente efetivos contra infecção. Portanto, fica claro que estas alterações permanecem até 6 meses, sendo que após 1 ano da vacinação os animais retornam à um perfil de biomarcadores basal, o que sugere a necessidade do reforço vacinal neste período ou até mesmo anterior a ele.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, Leishmune[®], citocinas.

Abstract

Visceral leishmaniasis is endemic in many regions of Brazil, and it is an important infectious disease caused by protozoan. Apart from humans, dogs are also seriously affected and, in urban areas, are considered the main reservoir of the disease. This species is characterized as a source of transmission for effective cohabit with people and often exhibit high rates of infection without having a seeming clinical condition. The current strategy for the control of this disease is based on the elimination of seropositive dogs, systematic human cases treatment and vector control. Although dog euthanasia is the main strategy to control the disease, it is not widely accepted, especially by the owners. However, the most often therapeutic strategies studied in dogs had failed to achieve a consistent parasitological cure in CVL. In this context, the development of a protective vaccine against CVL could be a promising tool for the control of CVL and consequently for human visceral leishmaniasis. Typically, there is a consensus that the cytokine microenvironment performs a central role in the outcome of the pathogenesis of leishmaniasis. The major effector mechanism involved in *Leishmania* immunoprotective response on infected dogs is the activation of macrophages by IFN- γ , leading to destroy the intracellular amastigote form mediated by the production of nitric oxide. The aim of our study was to evaluate the cytokine profile in dogs at different Leishmune[®] vaccination times, after *in vitro* stimulation with soluble antigen of *Leishmania chagasi*. We had used flow cytometry and ELISA method to analysis the cytokine production. Our results showed that Leishmune[®] was capable of the induction of increasing IL-8, IFN- γ , IL-17a and TNF- α production levels in the first and sixth months after vaccination, also IL-10 reduction rates in first and sixth month after vaccination and decreased IL-4 rates only six months after the vaccination. In the "T12 time" group of dogs, one year after vaccination, we did not find any significant difference in the cytokine profile for the group of non-vaccinated dogs group. The immunobiological changes aforementioned lead us to believe the immunization process promotes the development of a cellular immune response profile capable of inducing immunoprotection on vaccinated dogs. Therefore, it is clear that those changes remain up to 6 months whereas after 1 year after the vaccination the animal returns to a baseline profile of biomarkers, which suggests the necessity of the strengthen the vaccine either at this time or even before.

Keywords: canine visceral Leishmaniasis, Leishmune[®], cytokines.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses: conceito, ciclo biológico e epidemiologia

As leishmanioses são importantes doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Estes protozoários são seres unicelulares e heteróxicos, transmitidos por flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontrado no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo [1]. Este parasito foi descrito pela primeira vez, em 1903, por Leishman, próximo da época em que Donovan descreveu a espécie do parasito causador do Calazar [2,3,4,5].

As leishmanioses caracterizam-se por dois ciclos epidemiológicos principais, o zoonótico, onde o animal reservatório está envolvido na transmissão e, o antroponótico, onde o homem é o reservatório e a fonte de infecção do vetor [6,7]. Sendo assim, o ciclo zoonótico, apresenta, como principais reservatórios, animais vertebrados como a preguiça, o cão doméstico, os ratos e a paca [8]. O ciclo antroponótico acontece comumente na Índia, Iraque, Senegal, Mongólia e Namíbia [9]. Os parasitos podem apresentar três diferentes formas no ciclo biológico, a amastigota, a promastigota e a paramastigota. A forma amastigota tem característica ovóide ou esférica, uninucleada, com cinetoplasto em forma de bastão e com ausência de flagelo livre. A forma promastigota possui formato alongado e pequeno, é uninucleada, flagelada e possui cinetoplasto ovóide localizado na região anterior, enquanto a forma paramastigota possui formato achatado, sendo também flagelada, uninucleada e com cinetoplasto próximo ao núcleo. O ciclo biológico tem seu início quando a fêmea do inseto vetor pica um animal vertebrado infectado e, durante o repasto, adquire formas amastigotas que parasitam principalmente macrófagos presentes no sangue ingerido. Entre 15 horas e 7 dias após a picada, as formas de *Leishmania* já estão presentes no intestino médio do inseto vetor [10]. No lúmen intestinal, ocorre o rompimento destes macrófagos, liberando as formas amastigotas que se transformam em promastigotas procíclicas, dentro da membrana peritrófica. Estas formas se dividem rapidamente, fazendo com que a membrana peritrófica se rompa, permitindo que a *Leishmania* colonize o trato digestivo posterior, médio e anterior do flebotomíneo. Após isso, se transformam em promastigotas metacíclicas que são as formas infectantes do parasito [10]. Em novo repasto, as formas promastigotas metacíclicas presentes no trato digestivo anterior, probóscida, faringe

e esôfago são transmitidas pelo flebotomíneo a um hospedeiro vertebrado não infectado, através da regurgitação do inseto causada pelo bloqueio da válvula proventricular, devido ao intenso parasitismo no intestino anterior.

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), macrófagos teciduais e neutrófilos, onde, dentro do vacúolo fagocitário, sofrem diferenciação para formas amastigotas. Este vacúolo fagocitário se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo onde as formas amastigotas sofrem várias divisões binárias até o rompimento da célula [11], liberando as formas amastigotas que podem, assim, parasitar novos macrófagos e serem transmitidas a outro flebotomíneo durante novo repasto sanguíneo [4].

A Leishmaniose visceral zoonótica (ZVL), causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença infecciosa grave e endêmica para países do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia e América Latina. Nos últimos anos, a ZVL surgiu como uma preocupação de saúde pública, devido ao importante aumento de fatores de risco associados à mudanças ambientais, a migração humana e ao estado imunológico do hospedeiro [12,13].

O cão é o principal reservatório do parasita e apresentam um papel relevante na transmissão aos seres humanos. O surgimento de casos humanos de leishmaniose visceral (LV) em territórios anteriormente não endêmicos foi precedido por um aumento da incidência de infecção canina e o aparecimento de novos focos. Os cães têm sido responsáveis pela propagação da doença observados nas grandes cidades brasileiras, onde, desde de 1980, a doença tornou-se endêmica e epidêmica, resultando no aumento contínuo de casos humanos no Brasil [14].

O controle da ZVL é uma tarefa difícil, pois muitos animais permanecem assintomáticos após a infecção, mas, em alguns casos, ainda são capazes de transmitir o parasita, bem como aqueles que desenvolvem os sintomas da leishmaniose canina.

A quimioterapia corrente reduz ou elimina os sintomas clínicos, mas não atingem um nível parasitológico consistentemente para a cura em cães, persistindo portanto o risco epidemiológico [15].

A incidência anual no mundo está estimada em 500.000 casos de leishmaniose visceral e 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar, com

uma prevalência de 12 milhões numa população de risco de 350 milhões. Em vários países, tem-se observado um aumento no número de casos de leishmaniose cutânea como, por exemplo, no Brasil, onde foram notificados 21.800 casos em 1998, 30.550 em 1999 e 35.000 em 2000 [12,16].

Resposta imunológica do hospedeiro

O hospedeiro imunocompetente é capaz de ativar a resposta inflamatória inata e adquirida que irão estabelecer o grau de expressão da doença. Primeiramente, os macrófagos são ativados a um estado leishmanicida estimulado por uma resposta de células T auxiliares do tipo 1 (Th1). Esta resposta envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs), células T CD4⁺ e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Esta mesma resposta Th1 previne a manifestação da doença após um estado latente e o estabelecimento de fase crônica [17].

No sítio da infecção, uma resposta inata complexa inclui múltiplos fatores, como a presença de células (neutrófilos, monócitos/macrófagos, “Natural Killer- NK”, células dendríticas), mecanismos de reconhecimento de receptores (“Toll like Receptors”), mecanismos do sistema complemento e liberação de citocinas, em especial a IL-12 que auxilia na indução de imunidade mediada por células. Este complexo conjunto de mecanismos, em grande parte iniciado por células dendríticas infectadas, tem sua continuação com a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺. A migração destas células T efetoras para o local da picada se dá, tanto na leishmaniose tegumentar como na visceral, com a participação de moléculas de adesão e de quimiocinas. A partir daí, a resposta de células T CD4⁺ está associada à produção de IFN- γ e de outras citocinas como a IL-12, IL-2 e TNF- α . As células T CD8⁺ apresentam papel importante por produzirem IFN- γ e promoverem o maior desenvolvimento de células T CD4⁺, auxiliando no alcance da cura da doença [17,4].

Ao longo do desenvolvimento destes vários mecanismos na leishmaniose, são produzidas também citocinas reguladoras que agem balanceando a resposta imunológica. A IL-4, a IL-10 e a IL-13 são citocinas associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta do tipo 1, inibindo macrófagos e,

assim, favorecendo a infecção. Dados de um estudo realizado por Murray *et al.* (2002) demonstram que a ausência da IL-10 favorece a ativação da resposta do tipo 1, promovendo a eliminação do parasito e um sinergismo da resposta imunológica com a quimioterapia em infecções agudas [18].

No sítio da infecção, há migração de neutrófilos que iniciam a fagocitose dos parasitos. Uma vez interiorizados, se inicia um processo de eliminação do parasito pelas enzimas proteolíticas e por espécies reativas de oxigênio produzidas no interior dos lisossomos que se fundem com os fagossomos formando os fagolisossomos. Neste processo, ocorre ainda a produção de IL-8, essencial para a atração de novos neutrófilos. Da mesma forma, macrófagos são atraídos ao local da infecção, fagocitam o parasito e iniciam a produção de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-18 e IL-12 e de metabólitos tóxicos do oxigênio, como o ânion superóxido, o radical hidroxil, o peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico. A IL-12 e a IL-18 são citocinas que auxiliam na ativação de Th1, principalmente quando atuam em sinergismo. Mecanismos como a explosão respiratória (produção de intermediários reativos do oxigênio) e a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são importantes para a eliminação dos parasitos pelos macrófagos [19,20].

Em humanos, o principal mecanismo de eliminação da *Leishmania* por estas células resulta da ação de radicais de oxigênio e de óxido nítrico [21]. As células dendríticas, por sua vez, são potentes células apresentadoras de antígeno que induzem uma eficiente ativação de células T e produzem também citocinas como IL-12, IL-10 e IFN- γ . A IL-12 produzida tem grande importância no controle de infecções por *L. major* [22,23].

Embora o macrófago também seja capaz de produzir IL-12, na infecção por *Leishmania*, as células dendríticas são a principal fonte desta citocina e estas células são ainda essenciais para a manutenção de número suficiente de células Th1 de memória ou efetoras *in vivo* para mediar proteção prolongada contra *L. major* [17].

No fígado do cão infectado, a *Leishmania* parasita as células de Kupffer, causando um influxo de granulócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, resultando na formação de granulomas [24]. Muitas células T do granuloma apresentam fenótipo de memória ou de células ativadas em seis semanas de infecção com *L. chagasi*, o

que ocorre em menor nível com células do baço. Além disso, o granuloma hepático apresenta menor quantidade de células produtoras de IFN- γ que no baço e as células provenientes destes órgãos produzem quantidades semelhantes de IL-10, durante o cultivo *in vitro*. Desta forma, a IL-10 parece modular a produção de IFN- γ pelos esplenócitos, mas, no fígado, não é a única a modular a produção desta citocina, já que outros fatores parecem estar envolvidos na supressão da produção de IFN- γ [24]. Um destes fatores é o TGF- β cuja presença nos granulomas hepáticos está associada à inibição da resposta Th1 independente de citocinas Th2 [25].

Alguns estudos indicam que a resposta imunológica Th2 predomina durante uma infecção humana aguda num quadro de leishmaniose, com a supressão da reatividade de células T, predominância das citocinas IL-4 e IL-10 em relação ao IFN- γ e a ativação de células B policlonais, resultando em uma hipergamaglobulinemia [26]. O envolvimento de Th1 e Th2 na proteção e exacerbação da doença, respectivamente, tem sido demonstrado em modelo murino de leishmaniose cutânea [27] e visceral [28], principalmente porque a IL-4 pode regular a ação de macrófagos [29]. No entanto, parece possível que, em alguns casos de leishmaniose visceral, um padrão misto Th1 e Th2 seja ativado, conforme revelado pelos altos níveis simultâneos de IFN- γ e de IL-4 detectados em camundongos [30] e em cães [31]. Nestes casos, a IL-4 não apresenta um padrão imunoregulatório [32], como a IL-10 produzida por células Th3, macrófagos e linfócitos B. Desta forma, a regulação da IL-10 parece ser um ponto constante na clínica, já que esta citocina está associada à supressão da imunidade contra a leishmaniose visceral. Cillari *et al.* (1995) demonstraram, após detecção dos níveis de citocinas em soro de pacientes, um importante papel regulatório de IL-10 sobre a resposta de células T e o envolvimento desta citocina na patologia de infecções com *L. donovani* [33]. Quando analisados juntos, estes dados fornecem evidências da existência de uma dicotomia da IL-4. Esta citocina pode ter a capacidade de estimular a diferenciação de células dendríticas em células produtoras de IL-12 estimulando a resposta Th1 e a resistência à infecção. Ao contrário, sua produção por células T CD4⁺ pode estar relacionada com a susceptibilidade e o direcionamento da resposta para Th2 [26,34].

Algumas características do parasito e os mecanismos do hospedeiro se relacionam diretamente com a patogênese durante a infecção. Dependendo da espécie, a *Leishmania* consegue escapar da resposta humoral inata e remodelar mecanismos intracelulares em algumas células como macrófagos e células dendríticas, afetando fatores de transcrição e a expressão genética de citocinas [4]. Formas promastigotas da *Leishmania* são capazes de se interiorizar nos macrófagos de forma silenciosa, mantendo estas células desativadas e evitando assim a ativação da resposta imune. Desta forma, a resposta do macrófago à infecção com *Leishmania* é prejudicada uma vez que o parasito inibe a produção de citocinas, a expressão de moléculas de superfície e a geração de mecanismos leishmanicidas como a produção de intermediários reativos de oxigênio. Esta ação do parasito se estende ainda para as células dendríticas, que são fundamentais na apresentação do antígeno, na estimulação de células T e no eficiente desenvolvimento de uma resposta do tipo 1, e ainda, para os macrófagos o que pode se dar pela modulação negativa da expressão de moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classes I e II [35]. As ações do parasito sobre estas células incluem ainda a inibição da migração celular, da maturação e da ativação, limitando ainda a produção de IL-12 [4].

As formas promastigotas também podem utilizar mecanismos de defesa do organismo, como as proteínas do sistema complemento, para evadirem da resposta do sistema imune. Estas formas lançam mão da opsonização por estas proteínas para facilitar sua interiorização nos fagócitos mononucleares através da ligação com receptores de complemento presentes na superfície das células. No entanto, devido ao tamanho do lipofosfoglicano (LPG), presente na superfície celular de formas promastigotas metacíclicas, não ocorre a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e estes parasitos não são lisados [36,37]. Além disso, os LPGs são também capazes de interferir na função de monócitos/macrófagos e de células dendríticas através do bloqueio da adesão endotelial e migração pela alteração de expressão de moléculas de adesão e síntese da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) [4,38]. A mesma função exercem os proteofosfoglicanos (PPGs) na superfície das amastigotas através da interferência na função de monócitos/macrófagos [4,39].

Durante a infecção, o pH do vacúolo parasitóforo se mantém ácido, favorecendo a ação das proteínas microbicidas e das enzimas hidrolíticas. Entretanto, o parasito é capaz de inibir a produção de radicais de oxigênio e de água oxigenada no vacúolo, através da inativação de NADPH oxidase e da alteração do pH para menos ácido ou pode impedir a formação do fagolisossomo pela repulsão estérica do LPG [39], impedindo assim a ação de substâncias tóxicas presentes no lisossomo.

Outro fator importante para o sucesso da infecção é a saliva do inseto. A saliva possui algumas substâncias vasodilatadoras, imunoreguladoras, anticoagulantes e com capacidade de atrair neutrófilos e monócitos/macrófagos ao sítio de infecção do hospedeiro vertebrado. Uma destas substâncias é o maxadilan, um peptídeo presente na saliva do *Lutzomyia longipalpis*, muito importante no estabelecimento da infecção. A quimiotaxia gera um aumento da fagocitose, favorecendo a infecção de células e a sobrevivência e a proliferação do parasito, uma vez que a porcentagem de células infectadas e a porcentagem de parasitos dentro de cada uma destas células aumenta [40].

Tratamento, controle e vacinas contra leishmanioses

Os medicamentos recomendados para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral, os antimoniais pentavalentes, foram introduzidos há 60 anos. Nas últimas décadas, drogas alternativas e novas formulações se tornaram disponíveis para o uso em alguns países, enquanto outras estão sendo testadas. Apesar da dificuldade de se desenvolver uma droga única efetiva contra todas as formas de leishmaniose, muitos avanços foram feitos neste setor. Alguns dos problemas em se desenvolver tal droga incluem a diferença de órgãos acometidos na leishmaniose visceral e na tegumentar necessitando de farmacocinéticas distintas e da variação intrínseca da sensibilidade das várias espécies de *Leishmania* à droga. Além disso, há necessidade de medicamentos que alcancem a efetividade em pacientes resistentes aos antimoniais ou imunossuprimidos [41].

O tratamento, no Brasil, foi padronizado com o antimoniato de N-metil glucamina, como primeira escolha terapêutica, e, nos casos de resistência e de segunda escolha, o isotionato de pentamidina ou a anfotericina B.

Recentemente foi demonstrado que o antimoniato de N-metil glucamina pode promover, o influxo de tióis e de glutathiona, tanto na promastigota quanto na amastigota, deixando o parasito mais susceptível ao “stress” oxidativo. Apesar de sua ação importante, o antimoniato de N-metil glucamina apresenta uma alta cardiotoxicidade, o que faz com que o paciente que está hospitalizado para a administração parenteral, precise ser monitorado constantemente [42].

O isotionato de pentamidina vem sendo utilizado como segunda escolha para o tratamento das leishmanioses. Ele demonstrou ser efetivo nos casos de resistência ao antimonial, levando à cura cerca de 70% dos casos. No entanto, em alguns pacientes, verificou-se uma reação adversa irreversível com a formação de um quadro de diabetes mellitus dependente de insulina. Este fato fez com que o uso da pentamidina em alguns países, como a Índia, fosse completamente abandonado [42].

A anfotericina B, um antibiótico macrolídeo, é uma outra opção em casos de resistência ao antimoniato. Originalmente desenvolvida como fungicida, mostrou ser um efetivo leishmanicida, mas apresenta um dos maiores índices de toxicidade aguda, necessitando, por isso, ser cuidadosamente administrado [4, 42].

Para o controle da leishmaniose, a OMS recomenda: o tratamento de pacientes humanos, a eliminação de cães soropositivos e a borrifação de inseticida em casas [43, 44]. No entanto, a eutanásia dos cães infectados tem gerado um grande desconforto social tendo em vista o papel que os cães ocupam na sociedade atual o que tem dificultado a execução desta prática pelas autoridades sanitárias. Desta forma, este problema pode acarretar sérias interferências nos aspectos epidemiológicos da leishmaniose [45].

Segundo Maia-Elkhoury *et al.* (2008), a eutanásia de cães soropositivos não impediu o aumento do número de casos humanos no Brasil, enquanto outras medidas, tais como colares impregnados com inseticidas tópicos são caros e de difíceis implementação em um programa nacional de controle. Além disso, a disposição dos dados de campo não permitem uma estimativa do seu impacto epidemiológico [46,47].

A utilização de medicamentos ou outros compostos leishmanicidas em cães não tem mostrado resultados satisfatórios. Em alguns casos, ocorreram até a exacerbação do calazar, causando intensa dermatite [48], já em outros casos foram

observadas melhoria do estado clínico, mas permanecendo o parasitismo cutâneo [49], desta forma estes animais continuaram como fontes de infecção para vetores flebotomíneos.

Considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz, que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, e na ausência de outras estratégias bem sucedidas, o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose canina tem sido promovida como uma ferramenta importante para controlar ZVL [50,51]. De acordo com Gosh *et al.* (2003), Chappuis *et al.* (2007) e Palatnick (2008) existem evidências clínicas e experimentais que indicam que as leishmanioses seriam evitáveis pela vacinação.

Alguns estudos já foram realizados com o intuito de desenvolver uma vacina anti-LVC, porém, estes apresentaram resultados controversos ou pouco conclusivos, o que tem incentivado a busca de novos imunógenos que possam proporcionar uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LVC.

Em relação aos imunobiológicos empregados em intervenções vacinais na LVC podemos agrupá-los em três gerações de antígenos vacinais no que se refere ao processo de produção. A primeira geração, que se inicia com os primeiros estudos de vacinação contra a leishmaniose cutânea humana por Salles-Gomes (1939) e Pessoa *et al.* (1940) e se estende até os dias atuais, são preparações antigênicas tipicamente constituídas por antígenos brutos, obtidos através de técnicas de atenuação ou fixação dos agentes etiológicos de interesse. Considerando o seu largo espectro de antigenicidade, custo e segurança, estas vacinas compostas de antígenos brutos poderiam representar uma excelente ferramenta para imunoprofilaxia e controle da CVL em áreas endêmicas [57,58,59,60,61,62,63,64].

A partir dos anos 90, com o avanço das técnicas de biologia molecular começaram a surgir os primeiros candidatos constituídos por subunidades definidas, denominados antígenos recombinantes que marcariam a segunda geração de vacinas. Segundo Santos *et al.* (2002), as vacinas de segunda geração incluíram ainda, bactérias ou vírus recombinantes que carregariam genes que codificariam antígenos de *Leishmania*, além de utilização de vacinas vivas, com *Leishmania* geneticamente modificada, e que causaria infecção abortiva no homem [66].

Mais recentemente, no final dos anos 90, com o avanço dos estudos do genoma de diferentes agentes infecciosos começaram a surgir as vacinas de terceira geração (vacinas de DNA), constituídas de genes que codificariam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos, as quais teriam uma aplicação promissora no controle de diversas infecções [67,68,69]. Além disso, elas poderiam oferecer diversas vantagens quando comparadas às vacinas convencionais, como: estabilidade, baixo custo, facilidade de manipulação e preparação de formas multigênicas; imunização com DNA resultando na expressão de antígenos do parasito na sua forma nativa; indução de uma resposta imune celular e humoral prolongada, devido à persistência da expressão antigênica [70].

Os estudos empregando candidatos à vacina para leishmaniose no âmbito dos imunobiológicos de primeira geração têm mostrado alguns resultados importantes. Na Europa, foi desenvolvida uma vacina, constituída de uma preparação parcialmente purificada e liofilizada derivada de *L. infantum*, que quando aplicada em modelo experimental murino foi capaz de proteger os camundongos contra um desafio com *L. mexicana* e *L. major* [71,72]. Entretanto, quando avaliada experimentalmente em cães, foi observada apenas uma elevada produção de anticorpos incapazes de controlar a infecção [73]. Em um outro estudo piloto, onde cães domésticos residentes em área endêmica foram imunizados utilizando a mesma preparação antigênica, foi observado que além de não conferir proteção nos animais vacinados, promoveu um aumento da susceptibilidade dos cães à infecção [74].

Dentre inúmeros trabalhos que buscam o desenvolvimento de uma vacina de primeira geração contra a LVC, no Brasil destaca-se os realizados pelo grupo de leishmaniose do Departamento de Parasitologia da UFMG. Eles desenvolveram a Leishvacin, uma vacina composta por antígeno de promastigotas sonicadas. Os primeiros estudos desta vacina, que foram realizados em camundongos e humanos contra a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), era primariamente constituída de cinco cepas de *Leishmania* (*L. amazonensis*, cepa BH8; *L. major*-Like, cepa BH121; *L. major*-Like, cepa BH49; *L. guyanensis*, cepa M1176 e *L. amazonensis*, cepa PH8). Contudo durante o encontro realizado em Belo Horizonte pela organização mundial de saúde 1991 "Vaccine Advisory Group of Discussion", encontro que teve a participação de representante de organizações nacionais e

internacionais interessados no desenvolvimento de uma vacina contra LTA, foi sugerido que os estudos desta vacina deveriam continuar, no entanto, usando somente uma cepa de *Leishmania*, com a finalidade de padronizar a produção do antígeno vacinal. Desta forma, a cepa PH8 de *L. amazonensis* foi escolhida devido ao fato de seu antígeno bruto induzir altos índices de estimulação de linfócitos em de pacientes voluntários “*in vitro*”, pelo fácil crescimento em cultura utilizando meio acelular, além dessa cepa ser bem caracterizada taxonalmente [75,76,77,78].

Em 1996, Mayrink e colaboradores realizaram um estudo onde cães, mantidos em canil, foram imunizados com antígeno bruto sonicado de *L. braziliensis*, associado ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante. Os animais foram posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Ficou demonstrado neste estudo que os cães que receberam vacina constituída de *L. braziliensis* tornaram-se protegidos contra desafio com cepa heteróloga de *L. chagasi* [57]. Os cães foram observados por 26 meses, com acompanhamento parasitológico e imunológico a cada dois meses. Todos os cães controles, não vacinados, desenvolveram infecção (9/9) enquanto apenas um dos cães vacinados desenvolveu infecção patente (1/10). Os resultados mostraram proteção de 90% dos animais vacinados, após 470 dias de acompanhamento. Nenhum animal que apresentava habilidade em elaborar uma resposta de células T antígeno-específica apresentou sinais clínicos, enquanto todos os cães que apresentavam elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* tinham infecção patente. Estes resultados estimularam a realização de dois ensaios vacinais em população de cães no município de Montes Claros, MG, onde a LV é endêmica. Nesse estudo de campo foi observado, através de ensaios de linfoproliferação *in vitro*, que o desenvolvimento da LVC estava associado com uma inabilidade dos animais de montar resposta linfoproliferativa *in vitro* a antígenos de *Leishmania*. Entretanto, os resultados do teste de eficácia de vacinação não demonstraram o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *Leishmania* na população vacinada em relação ao grupo controle. A deficiência dos animais em estabelecer um padrão de resposta imune do tipo 1 poderia ter sido o responsável pelo insucesso da intervenção vacinal no estudo de campo realizado em Montes Claros / MG [57].

Outro grupo de destaque na pesquisa para desenvolvimento de vacina contra LVC é grupo do Dr. Reis e Dr.Giunchetti, na universidade Federal de Ouro Preto

(UFOP). Eles veem desenvolvendo uma vacina composta de antígenos bruto de *L. braziliensis* acrescido saponina como adjuvante (vacina LBSap). Em estudos anteriores a vacina LBSap mostrou ser segura para o uso, não sendo observadas lesões ulcerativas nos locais de inoculação [60,79]. Eles demonstraram que esta vacina induzia um aumento em isotipos de imunoglobulinas; níveis elevados de linfócitos T, particularmente CD8⁺, intensa proliferação celular; aumento da produção de NO durante a estimulação *in vitro*, e altos níveis de LT CD8⁺ *Leishmania*-específicos em cães após três doses da vacina.[60]

Em relação a imunobiológicos da segunda geração, candidatos à vacina contra a LVC, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo em colaboração com a HESKA Cooperation e o Infectious Disease Research Center (IDRI) – Seattle – USA avaliou a eficácia de vacinas constituídas de combinação de antígenos definidos de *Leishmania*, que favorecem o desenvolvimento de uma resposta linfocitária do tipo 1. As vacinas utilizados foram antígenos recombinantes LmSTI1 descrito por WEBB *et al.* (1996) e LeIF descrito por SKEIKY *et al.* (1995). Neste trabalho FUJIWARA *et al.* (2005) avaliaram aspectos da imunidade celular de cães submetidos a diferentes esquemas de vacinação empregando estes imunógenos. Os autores observaram os seguintes resultados: a avaliação do número absoluto de eosinófilos circulantes nos animais imunizados foi menor que o grupo controle; em relação ao número de linfócitos T absolutos circulantes não foi detectado uma grande variação nos números de valores absolutos durante o período estudado que pudesse ser associada a um perfil de imunoproteção ou susceptibilidade nos animais, sugerindo que as vacinas utilizadas, embora induzam um estado de imunogenicidade observada na sorologia e proliferação linfocitária, não alteraram ou então alteraram discretamente o número absoluto de células T. Em relação às subpopulações de linfócitos T os autores sugeriram que as vacinas utilizadas, alteraram o número de células T CD4⁺ e CD8⁺, sendo que redução do número de células CD4⁺ foi observada nos animais dos grupos imunizados com a combinação de três antígenos recombinantes (MAPS/TSA, LeIF e LmSTI1) e um aumento de células CD8⁺ para os grupos vacinados com associação de dois antígenos recombinantes (MAPS/TSA,e LmSTI1) e com consequente alteração nos valores da razão CD4⁺ /CD8⁺. No entanto, essas alterações nas subpopulações de células T parecem não estar associadas a um perfil de imunoproteção dos animais contra a infecção por

Leishmania. A análise dos resultados para linfócitos B CD21⁺ demonstrou queda nos valores absolutos dessas células para os grupos imunizados com vacinas, a despeito de alta produção de anticorpos antígenos-específicos, refletindo no aumento da razão entre linfócitos T e B. Quanto à população de monócitos circulantes houve um aumento durante a etapa de vacinação, após a segunda dose, para os grupos vacinais em relação ao controle. Os resultados obtidos por FUJIWARA *et al.* (2005) mostraram que embora estes antígenos tenham sido capazes de induzir um estado de imunogenicidade em cães vacinados, eles não ofereceram proteção após o desafio experimental com 10⁶ promastigotas de *L. chagasi* por via endovenosa.

Mais recentemente, o laboratório Pfizer, adquiriu a patente de uma vacina de segunda geração contra a LVC, conhecida por Leishmune®; sendo esta já licenciada pelo Ministério da Agricultura e disponível para comercialização, com perspectiva de constituir uma ferramenta eficaz para o controle da LVC. A Leishmune® foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Dra. Clarissa Palatnik de Sousa, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esta vacina é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina. O antígeno de FML foi descrito em 1989 e isolado de promastigotas de *L. donovani* [83,84]. Essa fração glicoprotéica que contém fucose e manose foi denominada FML e trata-se de um complexo que inibe fortemente a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de forma espécie específica [85,86]. O FML está presente na superfície da *Leishmania* durante todo seu ciclo e é comum a todas as *Leishmania* do complexo *donovani*, ou seja, é específico para as espécies que causam leishmaniose visceral. A saponina por sua vez é um potente adjuvante com capacidade de estimular a resposta imune ao antígeno promovendo aumento na síntese de várias citocinas, como IFN- γ , IL2, IL-4 e IL-10 [87].

Em 1996 começaram os ensaios para avaliar a eficácia da vacina FML na área endêmica de São Gonçalo do Amaranto-RN (estudos de fase III). Os cães vacinados foram avaliados por sorologia, pelo método ELISA-FML, e por teste de intradermoreação ao lisado de *Leishmania* (IDR) nos seguintes períodos: dois, sete, treze e vinte quatro meses após o programa vacinal completo. As diferenças entre as proporções de positividade nos animais vacinados e controles foram altamente

significativas ao longo de todo período. Além disso, os valores de absorvâncias determinados pelo ensaio de ELISA-FML nos soros e o tamanho das IDR foram significativamente maiores no grupo vacinado com FML do que nos controles, em todos os períodos avaliados. Após dois anos, 33% dos animais controles desenvolveram sinais clínicos de leishmaniose visceral ou doença fatal, enquanto apenas 8% dos cães vacinados mostraram sinais moderados da enfermidade, sem nenhum registro de óbito neste grupo. Estes resultados mostraram 92% de proteção contra a LVC no grupo vacinado, o que correspondeu a 76% de eficácia vacinal [84].

Em um segundo experimento de fase III, também em área endêmica, foi observado uma diferença ainda maior entre os grupos de animais. Todos os animais vacinados foram soropositivos no ensaio de ELISA-FML e mostraram IDR positiva dois meses após a vacinação completa, mostrando valores de absorvância e tamanho da IDR significativamente maiores do que os controles não vacinados, durante os 3,5 anos de acompanhamento do estudo. Vinte e cinco por cento dos animais controles e 5% dos vacinados desenvolveram doença clínica e fatal, representando 95% de proteção alcançada em cães vacinados com FML. Embora apresentassem maiores títulos de reatividade sorológica pela ELISA-FML e mostrassem IDR mais intensa, 95% dos animais vacinados, apresentavam PCR negativo na medula óssea e no sangue periférico [88].

Para avaliação da resposta imune humoral e celular da vacina Leishmune® os pesquisadores utilizaram 600 cães que foram testados previamente ao início da vacinação (D0), 30 dias após a terceira dose (D70) e sete meses após a primeira dose. O teste de intradermoreação (IDR) foi realizado sete meses após a primeira dose, com o intuito de mensurar a resposta imune celular. Trinta dias após o término do programa vacinal (D70), 98% dos cães apresentavam soroconversão, demonstrando que a vacina induziu resposta imune humoral. Sete meses após a primeira dose da vacina, 93% dos cães continuaram a apresentar sorologia positiva e 59% apresentaram IDR positiva, indicando resposta imune celular protetora ativa. Esses resultados foram similares aos obtidos nos estudos anteriores [84,89]. Sendo assim, os resultados obtidos e publicados, até o momento, colocam a Leishmune® como a primeira vacina mundial que promove longo e significativo efeito protetor em cães, contra a LVC. Evidências preliminares sugerem que a vacina Leishmune® também seja bloqueadora da transmissão. Desta forma, ela não somente protegeria

os cães da incidência e morbidade da doença [90], mas também os manteria não-transmissores quando infectados, bloqueando a transmissão para os flebotomíneos [91].

As vacinas de terceira geração, também chamadas de vacinas de DNA, são constituídas de genes que codificam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos [45, 69].

Um exemplo é a vacina Leish-tec®, produzida pelo laboratório Hertape Calier Saúde Animal e que foi desenvolvida pela equipe da Dr. Ana Paula Fernandes, pesquisadora da UFMG. A vacina baseia-se na imunização do cão com uma proteína de superfície denominada A2, presente em várias espécies de *Leishmania* capaz de induzir uma potente resposta do tipo 1. Esta imunização mostrou proteção contra *L. donovani* e por *L. amazonensis* em camundongos, associada à produção de INF- γ , forte resposta humoral e reduzida internalização de amastigotas nos macrófagos, o que a torna uma forte candidata à vacina contra LVC [30, 92].

No entanto, várias questões são levantadas com relação à segurança das vacinas de DNA, como a possibilidade de integração ao genoma do hospedeiro, aumentando-se o risco de formação de oncogêneses ou a inativação de genes supressores de tumor, a indução de resposta contra as células transfectadas, podendo resultar em doenças autoimunes e a indução de tolerância, o que poderia prejudicar a resposta a outras vacinas e infecções [93,94].

Outro antígeno de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas é o antígeno LACK, devido ao seu papel na imunopatogênese da infecção experimental por *Leishmania* e vem sendo estudado em alguns modelos de imunização na leishmaniose visceral [95]. Membros da família LACK estão envolvidos em várias funções fisiológicas da célula eucariota, dentre elas, a apoptose e a interação com sequências de proteínas envolvidas na replicação de DNA e síntese de RNA de *L. infantum* [96].

A eficácia da vacina de DNA LACK e da vacina contendo a proteína LACK vem sendo igualmente testadas e os resultados demonstram que a vacina de DNA LACK é capaz de induzir uma resposta protetora em camundongos BALBc inoculados com *L. major*, com alta produção de INF- γ , e que esta proteção é maior que a induzida pela vacinação com proteína LACK recombinante [93]. Em um outro estudo feito com modelo murino vacinado com vírus *Vaccinia* modificado para

expressar o antígeno LACK e inoculado com *L. infantum*, foi encontrada uma proteção significativa no linfonodo, no fígado e no baço, após um mês de vacinação, sendo que nesta proteção foi maior no linfonodo, com alta produção de INF- γ [97]. Um modelo parecido de vacinação que utilizou DNA LACK e, como reforço, o vírus *Vaccinia* recombinante com o mesmo gene antígeno LACK conferiu proteção contra infecção com *L. chagasi* em 60% dos cães vacinados [31].

Alguns antígenos expressos em amastigotas são também possíveis candidatos à vacinação. Um deles é a enzima cisteína proteinase (CP), natural ou recombinante. Esta enzima foi testada contra Leishmaniose visceral canina e demonstrou proteção na medula óssea dos cães vacinados, com produção alta de INF- γ pelas células mononucleares do sangue periférico [98].

Muitos estudos e descobertas neste ramo já serviram para aprimorar a análise do processamento e apresentação de antígenos e a caracterização dos alvos na resposta imunológica [99]. Dentre inúmeros trabalhos que buscam o desenvolvimento de uma vacina contra a LVC, fica evidente a necessidade de indução de uma resposta imune predominantemente do tipo 1 associada a maiores níveis de IFN- γ , IL-12 e a baixos níveis de IL-10, TGB- β , com ativação de monócitos CD14⁺, células T CD4⁺ e CD8⁺ [47,100].

Conforme visto, existem diversos antígenos candidatos vacinais. Neste sentido, torna-se fundamental a identificação de biomarcadores que indiquem imunoproteção em estudos que busquem o desenvolvimento e teste de vacinas contra LVC. Esta estratégia pretende contribuir para a identificação de um perfil diferencial de biomarcadores que possam ser associados à imunoproteção sendo preditivo de eficácia vacinal. Deste modo, a identificação deste perfil poderia ser empregado para orientar o desenvolvimento e teste, de modo mais racional, de candidatos vacinais contra LVC.

JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral canina é endêmica em muitas regiões do Brasil. Nos últimos anos, várias cidades nas regiões sudeste, norte, nordeste e centro oeste, incluindo, Montes Claros e Belo Horizonte-MG, São Paulo-SP, Bauru-SP, Campo Grande-MT, Teresina-PI, Salvador-BA, São Luis-MA e Palmas-TO têm registrado surtos desta zoonose, enfatizando o seu importante papel no contexto da saúde pública em âmbito nacional. A necessidade da eliminação dos cães infectados, dada a sua relevância como reservatórios domésticos da doença humana, tem trazido um grande impacto social, considerando que, o sacrifício destes animais é sempre traumático para os proprietários e de difícil execução pelas autoridades sanitárias. Muitas vezes, os proprietários dos animais infectados se recusam a sacrificá-los, transferindo-os para outros domicílios, interferindo em aspectos epidemiológicos relevantes da leishmaniose, através da ampliação de áreas de risco. Maior gravidade neste processo é a possibilidade de cães infectados, ainda assintomáticos, funcionarem como potentes reservatórios da infecção, arriscando a saúde de outros animais e de pessoas co-habitantes das regiões afetadas. Tais fatos chamam a atenção para a importância da implementação de uma vacina anti-leishmaniose visceral canina que possa ser empregada em campanhas efetivas de profilaxia e controle da infecção canina.

Embora existam estudos sobre a eficácia de imunobiológicos de primeira, segunda e terceira geração vacinal para o controle da LVC, os estudos que abordam aspectos funcionais dos cães vacinados ainda requerem maior esclarecimento.

Neste contexto, este trabalho focalizou no estudo de aspectos funcionais da imunidade protetora induzida por vacina anti-LVC, empregando protocolos de investigação capaz de avaliar o impacto da primovacinação dos cães utilizando a vacina Leishmune[®] e sua capacidade de alterar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas e secretadas, quando leucócitos do sangue periférico são estimulados *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania*. Isto nos permitiu um estudo detalhado da resposta imune e também proporcionou confrontar e ampliar o conhecimento acerca da dinâmica da resposta imune desencadeada pela vacina. Os dados obtidos após a realização deste trabalho serão empregados para elaboração de um protótipo de um kit para predição de imunoproteção, com o intuito de que este possa futuramente ser empregado em cães já imunizados com diferentes imunobiológicos que possam surgir contra LVC, buscando predizer se animais

imunizados necessitariam ou não de dose reforço para indução de imunoproteção. Além disto, uma vez validado, este kit poderá ser empregado na seleção de candidatos vacinais contra LVC, em função da facilidade da predição de imunoproteção, após o protocolo vacinal, favorecendo a escolha de antígenos candidatos mais efetivos. Portanto, este estudo além de nos proporcionar um levantamento da resposta imune gerada pela vacinação, contribuiu para a análise da efetividade vacinal de um imunobiológico comercialmente disponível com ênfase na duração desta imunidade no período recomendado pelo fabricante.

OBJETIVOS

1 - Objetivo Geral

Avaliar a duração da imunidade vacinal contra a Leishmaniose visceral canina através do estudo do perfil de citocinas intracitoplasmáticas e secretadas por leucócitos do sangue periférico de cães imunizados com a vacina Leishmune[®] após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*, considerando um intervalo de 1, 6 e 12 meses pós-vacinação.

2- Objetivos específicos

2.1) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] no perfil de citocinas secretadas (IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) no sobrenadante da cultura do sangue periférico após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* empregando a técnica de *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA);

2.2) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] no perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-4) em linfócitos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* empregando a técnica de citometria de fluxo;

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Neste trabalho foram utilizados 40 cães, cujo sangue foi coletado nas clínicas veterinárias *Santo Agostinho*, *Estimação animal*, *Buritis*, *Castelo dos Bichos e Cão e cia.* todas situadas no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os cães participantes foram selecionados dentre os prontuários que se enquadravam no perfil buscado de acordo com critérios listados a seguir:

Critérios de inclusão:

- ✓ Animais saudáveis
- ✓ Sorologia negativa para Leishmaniose;
- ✓ Idade inferior a 8 anos;
- ✓ Carteira de vacinação atualizada;
- ✓ Tratamento anti-helmíntico regular.

Critérios de exclusão:

- ✓ Sorologia positiva para Leishmaniose;
- ✓ Infecções com outros patógenos;
- ✓ Intervenções cirúrgicas recentes ou outros procedimentos que possam alterar a resposta imune.

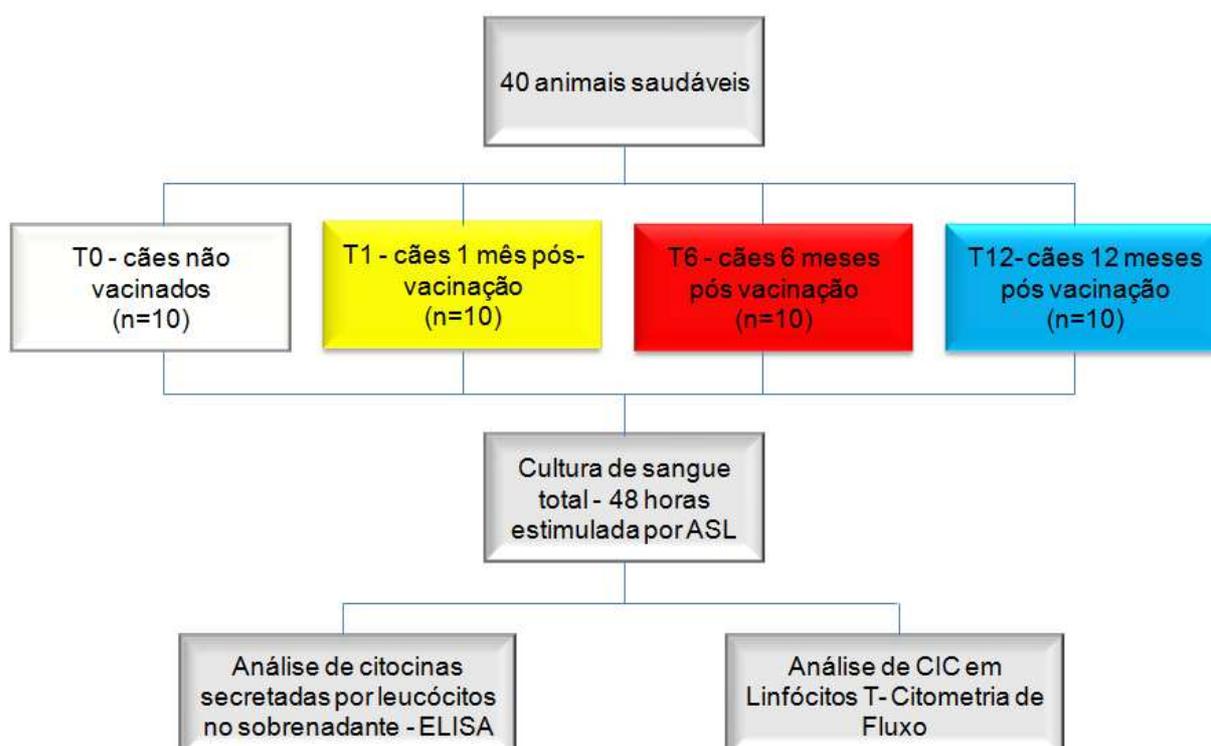
A seleção aleatória dos cães em diferentes clínicas contribuiu para uma melhor representação dos efeitos da vacina na população canina, já que inclui diversas variantes normalmente observadas no mercado. Essas variantes incluem: diversas raças e idades, vacinação em diferentes épocas do ano, vacinação com distintos lotes do imunobiológico e os diferentes ambientes de criação e regime alimentar de cada animal. Participaram do estudo 18 machos e 22 fêmeas, com idades entre 8 meses e 6 anos, vacinados ou não com Leishmune®, os quais foram homogeneamente divididos em quatro grupos (T0, T1, T6 e T12), conforme desenho esquemático no quadro 1. O grupo T0 são cães não vacinados contra a LVC e T1, T6 e T12 são cães vacinados com um mês, seis meses e doze meses respectivamente.

Quadro 1: Composição dos grupos (T0, T1, T6 e T12)

Marcador	Tempo decorrido após vacinação	Número de animais no grupo
T0	-	10
T1	1 mês	10
T6	6 meses	10
T12	12 meses	10

Todos os cães participantes dos grupos T1, T6 e T12 foram animais primo vacinados com Leishmune[®], de acordo com protocolo de imunização recomendado pelo fabricante (três doses com intervalos de 21 dias entre elas). O estudo foi realizado de maneira seccional, assim cada cão participou de apenas uma coleta e, conseqüentemente, de apenas um grupo. Todos os procedimentos descritos nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal CEUA - FIOCRUZ (PROTOCOLO No. P-71/11-3).

Diagrama 1- Desenho experimental –Avaliação da resposta imune celular



2- Amostras

Para a realização dos protocolos experimentais descritos a seguir, foram coletados de cada cão de 5 mL sangue periférico em tubos contendo anticoagulante heparina sódica. A quantificação de leucócitos foi realizada através de hemogramas em amostras de 1 mL, coletadas independentemente em tubos contendo anticoagulante EDTA. Todas as coletas foram realizadas com no máximo de 24 horas de antecedência ao experimento e todas tiveram consentimento dos proprietários.

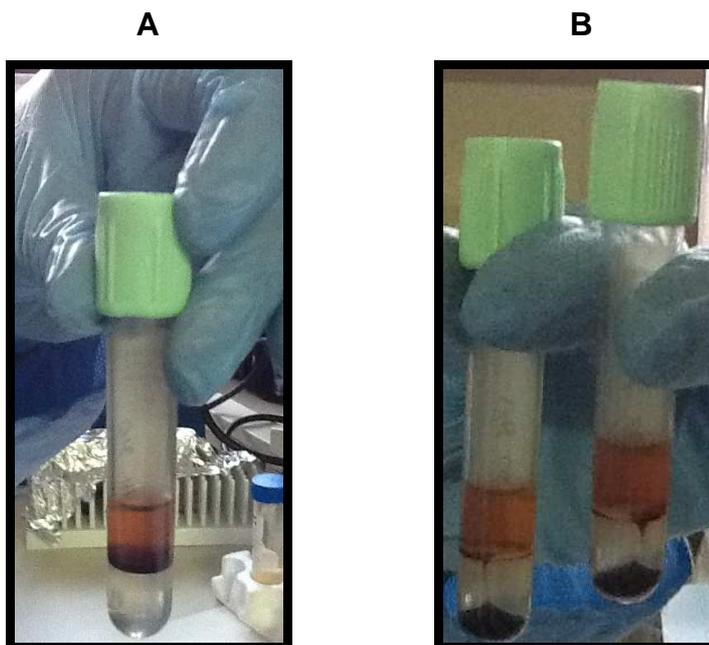
3 - Vacinas

Neste trabalho foi utilizada a vacina Leishmune[®], desenvolvida pela Dr^a. Clarissa Palatnik e colaboradores da UFRJ e atualmente comercializada pela Pfizer[®]. Esta vacina é composta pelo complexo glicoprotéico Ligante de Fucose e Manose (FML) de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina.

4 - Desenvolvimento de Protótipo do Kit para avaliar predição de proteção dos animais vacinados contra LVC

Para desenvolvimento de protótipo do Kit para avaliar predição de proteção de animais vacinados contra LVC, utilizamos 3 tubos heparinizados com gel de lítio separador (Tubo BD Vacutainer[®] PST) .O primeiro tubo recebeu somente a amostra de sangue periférico do cão a ser testado diluído 1:1 em RPMI, cultura controle. No tubo 2, determinado como cultura estimulada, foi adicionado nas 4 últimas horas de incubação, 25 µL de PMA (estímulo pan-leucocitário) diluído previamente 1:1000 da solução estoque (solução 1mg/mL) e 2 µL de Ionomicina (solução 1mg/mL). E por último, o terceiro tubo, denominado cultura sob estímulo de ASL, recebeu sangue diluído 1:1 em RPMI e 25 µL de antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL) na concentração de 1mg/mL.

Estes tubos foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, CO₂ e 5% de umidade, após este período eles foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas secretadas por leucócitos periféricos.



Fotografia 1 – (A) Tubo com cultura de sangue total após 48 horas de cultivo sob estímulo, anterior a centrifugação - (B) Tubo com cultura de sangue total após 48 horas de cultivo sob estímulo, posterior a centrifugação.

5 - Avaliação da Resposta Imune Celular

Para avaliação da resposta imune celular foram traçados dois delineamentos experimentais, um através do ensaio da imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas avaliada por citometria de Fluxo e outro através da análise de citocinas solúveis secretadas no sobrenadante da cultura, utilizando *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA).

No primeiro, foram realizadas imunofenotipagens com marcadores de superfície celular para as subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) e marcadores de citocinas intracitoplasmáticas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-4) em células do sangue periférico submetidas à cultura *in vitro* de sangue total por 48 horas, na ausência ou presença do antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL) (conforme descrito na seção 4), utilizando a técnica de citometria de fluxo. No segundo, foram realizadas ELISA para determinação dos níveis de citocinas (IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) secretadas por leucócitos periféricos após cultura *in vitro*, sob estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*, por 48 horas.

Dez animais não vacinados, que serviram como controle, tiveram seu sangue avaliado (tempo 0) e 10 animais correspondentes aos tempos 1, 6 e 12 meses pós

vacinação tiveram seu sangue avaliado posteriormente após protocolo completo de vacinação.

6 - Obtenção do Antígeno Solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL) utilizado como estímulo dos leucócitos nas culturas de sangue total por 48 horas

6.1- Obtenção da massa de promastigotas

Culturas de *L. chagasi* (cepa BH 46) foram mantidas em erlenmeyers contendo meio ágar-sangue, Novy-Mac-Neal-Nicolle (NNN) associado ao Liver Infusion Tryptose (LIT), em estufa B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, durante quatro dias. Posteriormente, 10mL desta cultura foram adicionados em erlenmeyers de capacidade para 2,5L que continham 500mL de meio LIT. Depois de adicionados os parasitos, as culturas foram mantidas em estufa a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Diariamente as culturas foram homogeneizadas por movimentos circulares suaves. Decorridos 8 dias, alíquotas foram retiradas para constatação da viabilidade e certificação da ausência de agentes contaminantes. Estando a cultura aprovada nestes quesitos, a mesma foi centrifugada a $800 \times g$, durante 10 minutos a 4°C para obtenção das formas promastigotas. Então, o sobrenadante foi descartado e a massa de parasitos foi ressuspensa em PBS (0,15M, pH 7.2) e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Tal procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Por fim, a massa obtida foi armazenada à -70°C , até o momento do preparo do extrato antigênico.

6.2 - Preparo do Antígeno Solúvel de *Leishmania* (ASL)

Para obtenção desse antígeno, massa de *Leishmania* obtida conforme descrito no item anterior (6.1) foi submetida a dez ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C . Após essa etapa, a massa de parasitos foi submetida a três ciclos de rompimento mecânico utilizando-se um homogeneizador elétrico com pistão de teflon (Virtis) por 1 minuto a 5000 rpm com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o material antigênico foi ressuspensa em 25mL de PBS (0,15M, pH 7,2) e centrifugado a $50\ 000 \times g$ por 1 hora e 30

minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o antígeno solúvel de *Leishmania* foi coletado e transferido para membrana de diálise, e então dialisado contra PBS (0,15M, pH 7,2) a 4°C, sob agitação constante, durante 24 horas. Por fim, o antígeno foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 µm em condições de fluxo laminar.

Uma alíquota foi retirada para dosagem da concentração de proteínas pelo método de LOWRY(1951). Alíquotas do antígeno com a concentração protéica de 1000 µg/mL foram feitas e mantidas congeladas a -70°C, até o momento do uso.

7- Ensaio da imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas

Foram coletados aproximadamente 5mL de sangue periférico, utilizando-se seringas plásticas estéreis e tubos de ensaio heparinizados.

Em 3 tubos de polipropileno estéreis numerados sequencialmente, foram adicionados respectivamente 500 µL do sangue coletado e diluídos 1:1 com RPMI 1640. O tubo 1 foi determinado como cultura controle. No tubo 2, determinado com cultura estimulada, foi adicionado nas 4 últimas horas de incubação, 25 µL de PMA (estímulo pan-leucocitário) diluído previamente 1:1000 da solução estoque (solução 1mg/mL) e 2 µL de Ionomicina (solução 1mg/mL). No tubo 3, com cultura sob estímulo com ASL, foi adicionado 25 µL de ASL na concentração de 1mg/mL.

Os tubos foram incubados em estufa de CO₂ a 37°C e 5% de umidade por 48 horas. Nas 4 últimas horas de incubação foram adicionados em todos os tubos 10 µL de Brefeldina A (solução 1mg/mL).

Foram adicionados 110uL de EDTA (20mM) em cada tubo, para obter uma concentração final de 2mM. O EDTA foi preparado no momento do uso diluindo uma solução estoque de 200mM (diluição 1:10 em PBS 1X). Os tubos foram homogeneizados suavemente em vórtex e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 7 minutos, a temperatura ambiente. Foram adicionados 3mL de PBS-W (solução salina tamponada com fosfato-PBS = 0,15M, 8g/L de NaCl, 2g/L de KCl, 2g/L de KH₂PO₄ e 1,15g/L de Na₂HPO₄, pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de azida sódica) em cada tubo, homogeneizados manualmente e centrifugados por 7

minutos a 400 x g , 18°C. O sobrenadante foi retirado utilizando a bomba de vácuo, deixando aproximadamente 1,0mL no tubo. Após homogeneização em vórtex, foram retirados 2x 50 ul de sangue e colocados em 2 tubos de polipropileno de 5 ml (controle branco e controle sem ANTI-citocinas). Em outro tubo, foi adicionado 8ul de anticorpo Anti CD4 FITC + 6ul de anticorpo Anti CD8 A647. O restante do sangue foi transferido para este último tubo, homogeneizado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Foram adicionados 3,0mL de solução de lise ((FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluído 1:10 em água destilada em cada tubo. A solução de lise foi adicionada simultaneamente a homogeneização em vórtex. Os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz e posteriormente centrifugados a 400 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas suavemente em vórtex.

Foi adicionado 500uL de PBS-W e 3,0mL de PBS-P (PBS contendo 0,5% BSA, 0,5% saponina e 0,1% de azida sódica) em cada tubo e homogeneizados lentamente por pelo menos 10 vezes por inversão (tubos fechados no segundo estágio). Os tubos foram então incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, os mesmos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g a 18°C. Os sobrenadantes foram desprezados, e o sedimento homogeneizado suavemente em vórtex.

O volume da suspensão celular foi ajustado com 160uL de PBS-P. Desta suspensão celular, foram retirados 30µL para marcação com anticorpo anti-citocina de cada uma das citocinas avaliadas (anti-IL-17a, anti-TNF- α , anti-INF- γ , anti-TFG- β , anti-IL-4). Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 1. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes, sendo a primeira com 130µL de PBS-P e a segunda, com 140µL de PBS-W através da centrifugação das amostras a 400 x g, por 7 minutos, a temperatura ambiente. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi ressuspensado suavemente em vórtex e posteriormente adicionando 150µL de solução fixadora MaxFacsFix (MFF) (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). A suspensão celular foi transferida para microtubos, os mesmos foram acondicionados em geladeira e posteriormente

submetidos à aquisição dos dados, onde foram avaliados um total de 30.000 eventos. A análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). Em todos os experimentos foram analisados os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

Quadro 2 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas *in vitro*

Marcador	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Fabricante
Anti-CD4 canino	Rato	YKIX302.9	FITC	Serotec
Anti-CD8 canino	Rato	YCATE55.9	A647	Serotec
Anti-IL17-a humana	Camundongo	64DEC17	R-PE	BD Pahrmingen
Anti-TNF- α humana	Camundongo	MAb11	R-PE	BD Pahrmingen
Anti-IFN- γ bovino	Camundongo	CC302	R-PE	Serotec
Anti-TGF- β humana	Camundongo	TB21	R-PE	IQ Products
Anti-IL 4 bovino	Camundongo	CC303	R-PE	Serotec

8 - Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas de sangue total

Determinação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ expressando citocinas intracitoplasmáticas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4)

A análise das frequências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando citocinas intracitoplasmáticas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4) foi realizada empregando a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 1A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low}, foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4/FL1 ou

CD8/FL3 *versus* IL-17a / FL2, TNF- α / FL2, IFN- γ / FL2, TGF- β / FL2 ou IL-4/FL2 para determinar o percentual de células IL-17a⁺, TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺, TGF- β ⁺ e IL-4⁺ dentro da população de linfócitos previamente selecionada em R1. Como exemplo, abaixo, está demonstrada a sequência utilizada para análise em linfócitos T CD4⁺ TNF- α ⁺ e T CD8⁺IL-4⁺ em cultura estimulada com ASL (Figura 1B e Figura 1C).

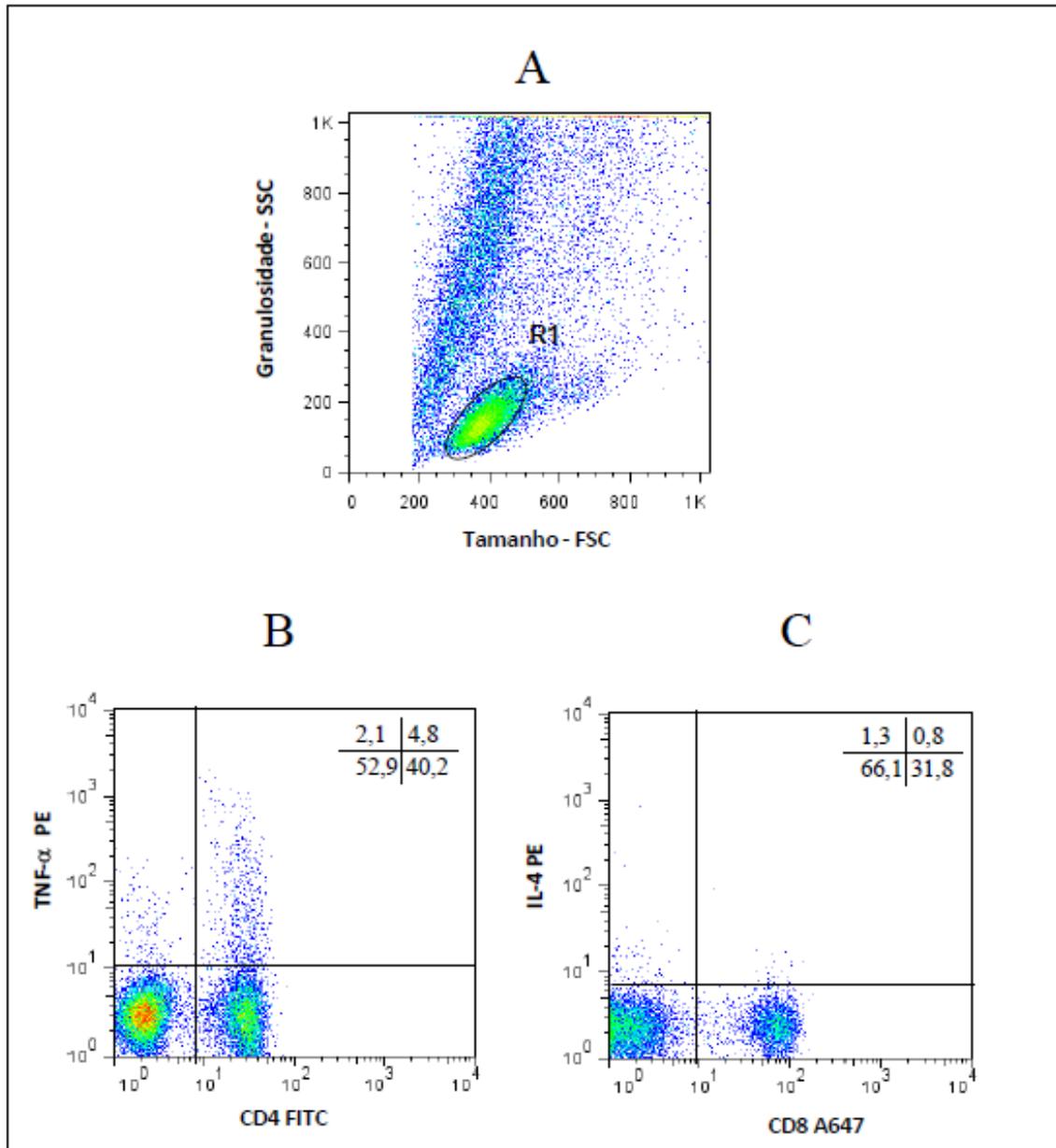


Figura 1 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4⁺TNF-α⁺ e TCD8⁺IL-4⁺ na cultura de sangue total de cães não vacinados e imunizados com a Leishmune[®]. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC^{Low}SSC^{Low} (B) Gráfico de distribuição pontual CD4 FITC/FL1 *versus* TNF-α PE/FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4⁺ TNF-α⁺ em cultura estimulada com ASL (C) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD8 A647/FL3 *versus* IL-4/FL2, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD8⁺ IL-4⁺ em cultura estimulada com ASL. Nos quadrantes superiores à direita estão indicados os percentuais das frequências correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

9- Análise de citocinas secretadas por leucócitos periféricos por meio de *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA)

Para este procedimento, foram coletados aproximadamente 5mL de sangue periférico de cão, utilizando-se seringas plásticas estéreis e tubos de ensaio heparinizados.

Em 3 tubos com heparina de lítio e gel separador (Tubo BD Vacutainer® PST) numerados sequencialmente, foram adicionados respectivamente 500 µL do sangue coletado e 500 µL de RPMI 1640.

O primeiro tubo recebeu somente a amostra de sangue periférico do cão a ser testado diluído 1:1 em RPMI, tubo cultura controle. No tubo 2, determinado como cultura estimulada, foi adicionado nas 4 últimas horas de incubação, 25 µL de PMA (estímulo pan-leucocitário) diluído previamente 1:1000 da solução estoque (solução 1mg/mL) e 2 µL de Ionomicina (solução 1mg/mL). E por último, o terceiro tubo, denominado tubo cultura sob estímulo ASL, recebeu sangue diluído 1:1 em RPMI e 25 µL de antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL) na concentração de 1mg/mL.

Estes tubos foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, CO₂ e 5% de umidade. Após incubação os tubos de teste foram centrifugados a 1400 x g por 10 minutos para separação do sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para microtubos tipo eppendorf de 2,0 ml e congelados à -70°C para posterior quantificação de citocinas solúveis através do ensaio de ELISA.

9.1- Quantificação de IL-8, TNF-α, IL-4, e IL-10

A determinação dos níveis de IL-8, TNF-α, IL-4, e IL-10 secretados por leucócitos foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se o sobrenadante de cultura de sangue. Foram utilizados anticorpos e proteínas recombinantes adquiridos da empresa R&D Systems (Minneapolis, USA). A cada poço de uma placa de 96 orifícios (COSTAR®, USA) foram adicionados 25µL de anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada, diluído em PBS estéril. As placas foram cobertas e incubadas durante o período noturno à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados por inversão e lavados 4

vezes sucessivamente com 100µL da solução de PBS-Tween 20. A seguir, as placas foram bloqueadas com 75µL/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1% e 0,05% de azida sódica (NaN₃), durante uma hora, em temperatura ambiente, e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras do sobrenadante de culturas foram aplicadas em um volume de 25µL em cada poço da placa. Paralelamente, cada citocina recombinante avaliada foi diluída em diferentes concentrações para estabelecimento de uma curva padrão, sendo a diluição realizada em solução PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). As placas foram vagarosamente homogeneizadas por um minuto e, em seguida, cobertas e incubadas por uma hora e meia, em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com 100µL de PBS-Tween 20. Em seguida, foi adicionado 25µL do anticorpo biotilado diluído apropriadamente em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃), em cada poço da placa. As placas foram mais uma vez mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente, por uma hora e meia, e em seguida, foram lavadas utilizando PBS-Tween 20. Então, após remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada poço 25µL de avidina peroxidase (R&D Systms, Inc., Minneapolis, USA, DY998) diluída em PBS contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,05% de azida (NaN₃). As placas foram incubadas a temperatura ambiente, por 20 minutos, ao abrigo da luz. Após a incubação, foram novamente lavadas 4 vezes sucessivamente com 100µL da solução de PBS-Tween 20 e, em cada poço, foi adicionado 25µL da solução de substrato (mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina). Mais uma vez as placas foram incubadas a temperatura ambiente, por 30 minutos e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 25µL por poço da solução de parada (H₂SO₄, 1M). A densidade óptica foi determinada usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) empregando comprimento de onda de 450 nm.

9.2- Quantificação de IFN-γ

Para determinar os níveis de IFN-γ, foram utilizados os kits DuoSets (R&D Systms, Inc., Minneapolis, USA., DY1969, DY781) para realização do ensaio ELISA de captura em amostras de sobrenadante das culturas. O ensaio foi feito de acordo com instruções do fabricante dos kits DuoSets. Foram utilizadas placas de 96 poços

(COSTAR, USA), onde foi feita a sensibilização, por toda a noite, com 25µL do anticorpo de captura diluído em PBS estéril, na concentração de 0,8µg/mL. As placas foram lavadas 4 vezes com 100µL solução de lavagem PBS-Tween 20 e incubadas, em temperatura ambiente, com solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) por 1 hora. Foi realizada uma nova etapa de lavagem com 100µL de PBS-Tween 20 e, em seguida foi adicionado 25µL da amostra, sem diluição, em cada poço. Paralelamente, para estabelecimento da curva padrão, foi adicionado 25µL da proteína recombinante de cada citocina, diluída em PBS com 1% de BSA, em diluição seriada, começando com a concentração inicial de 4000 pg/mL. Após 2 horas de incubação, em TA, foi repetido o processo de lavagem com 100µL de solução PBS-Tween 20 e aplicado 25µL de Streptoavidina-HRP. Após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi repetido o processo de lavagem com 100µL da solução PBS-Tween 20. Então foi adicionado 25µL da solução substrato, que corresponde a uma mistura 1:1 do reagente de cor A, H₂O₂, e reagente de cor B, tetrametilbenzidina (R&D Systems, DY999). Após 20 minutos de incubação, em temperatura ambiente, foi adicionado 13µL da solução de parada (R&D Systems, DY994). A determinação da densidade óptica foi feita imediatamente, usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL800) empregando comprimento de onda de 450 nm.

10 - Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 5.03. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica, foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Para dados com distribuição não paramétrica foi empregado o teste Kruskal-wallis, seguido pelo Teste de Dunns. Análises de correlação entre variáveis de distribuição paramétrica ou não paramétrica foram realizadas pelos testes Pearson ou Spearman, respectivamente. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1-Impacto da imunização com Leishmune[®] no perfil de síntese de citocinas em leucócitos do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro*

Visando confirmar as hipóteses propostas de recrutamento seletivo de células da imunidade adaptativa e inata no contexto da vacinação com Leishmune[®], foi proposto avaliar aspectos funcionais dessas células, como síntese de citocinas. Para tal, foram realizados protocolos de cultura de sangue total *in vitro* sob estímulo por 48 horas, de cães não vacinados (T0) grupo controle sem vacinação, 1 mês após vacinação, (T1), 6 meses após vacinação (T6) e 1 ano após vacinação (T12). As culturas foram realizadas na ausência e na presença de antígenos solúvel de *Leishmania chagasi*. A análise da síntese de citocinas solúveis secretadas por leucócitos periféricos foi realizada através do protocolo de Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) das citocinas (IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) e análise de citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T através de imunofenotipagem em plataforma de duas cores, permitindo a análise simultânea do fenótipo de superfície celular (CD4 e CD8) e de citocinas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4), empregando a citometria de fluxo.

Os resultados foram analisados empregando três abordagens distintas: 1) Análise quantitativa das citocinas; 2) Análise da frequência cumulativa das citocinas 3) Análise da frequência através do emprego da assinatura dos parâmetros avaliados na cultura controle e na cultura estimulada para cada grupo de animal.

1.1- Perfil de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

A figura 2 mostra os resultados da concentração em picogramas por mL de citocinas secretadas por leucócitos do sangue periférico dos animais vacinados contra LVC após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* nos grupos de animais não vacinados (T0), com 1 mês (T1), seis meses (T6) e um ano (T12) pós vacinação.

A análise dos dados demonstrou que grupo de animais com 6 meses de imunização com Leishmune[®] (T6), apresentou um aumento significativo das citocinas pró inflamatórias IL-8 e IFN- γ secretadas por leucócitos quando comparados ao grupo controle (sem vacinação = T0). Vale destacar que o aumento de IFN- γ , também foi observado no 1^o mês pós vacinação contra LVC (T1).

Por outro lado, as análises demonstraram, que o grupo de animais com 6 meses pós vacinação (T6), apresentou um decréscimo da citocina IL-10 no sobrenadante da cultura de sangue total. Já à secreção das citocinas TNF- α e IL-4, nenhuma diferença significativa foi observada, em relação ao grupo de animais não vacinados (T0).

Os dados demonstraram que todas citocinas avaliadas, inclusive as que haviam apresentado alteração aos seis meses, não apresentaram diferenças significativas quando foram avaliadas no grupo de animais com doze meses pós vacinação (T12); esta informação sugere a necessidade de revacinação dos animais, talvez em um período inferior a um ano como recomendado pelo fabricante da vacina.

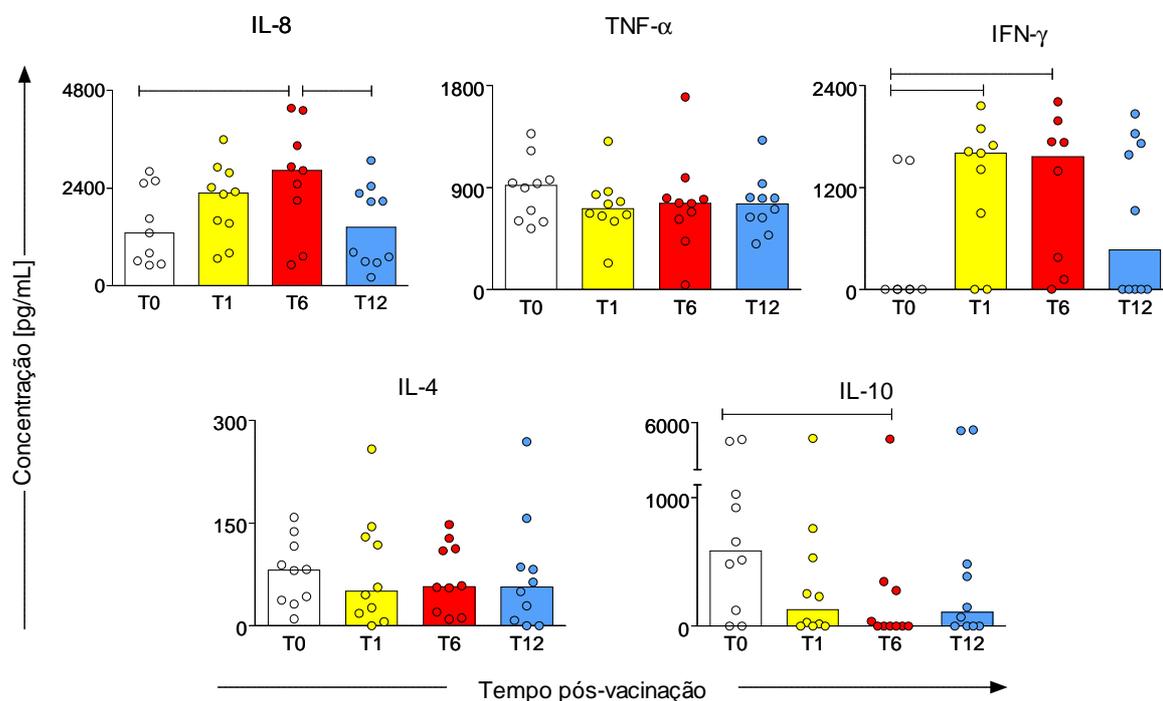


Figura 2 - Perfil de citocinas secretadas por leucócitos do sangue periférico de cães após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. (T0) Grupo de animais não vacinados; (T1) Grupo de animais com 1 mês pós vacinação, (T6) Grupo de animais com 6 meses pós vacinação, (T12) Grupo de animais com 12 meses pós vacinação. Os resultados estão expressos sob a forma de concentração em picogramas/mL (pg/mL) \pm erro padrão por tempo pós-vacinação. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p \leq 0,05$.

1.2- Análise da frequência cumulativa de cães apresentando diferentes níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania chagasi*

A figura 3 mostra os resultados da frequência cumulativa (%) de cães apresentando diferentes níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

A análise dos dados relativos a secreção de IL-8, demonstrou que 80% dos cães 6 meses pós vacinação (T6) tiveram um aumento significativo quando comparados a concentração da citocina no sobrenadante da cultura de sangue dos cães não vacinados (T0) e também do sobrenadante do sangue dos animais com 12 meses pós-vacinação (T12).

A análise dos dados relativos à secreção de IFN- γ , demonstrou um aumento da quantidade de IFN- γ secretada por leucócitos periféricos em 80% do grupo dos animais com um mês pós vacinação (T1) e 6 meses pós vacinação (T6) quando comparados concentração da citocina no sobrenadante das culturas do sangue do grupo de cães controle (T0).

A análise dos dados relativos à secreção de IL-10, demonstrou por sua vez, que quando o número de cães alcança 80% do n total, ocorre um decréscimo da citocina IL-10 no sobrenadante da cultura de sangue total do grupo de cães imunizados após 6 meses da vacinação (T6) quando comparado aos do grupo de cães controle (T0).

A análise dos dados relativos à secreção de TNF- α e IL-4, não demonstrou nenhuma diferença significativa na concentração destas citocinas no sobrenadante da cultura de sangue dos grupos estudados quando a porcentagem de cães alcança 80% da frequência cumulativa de cães.

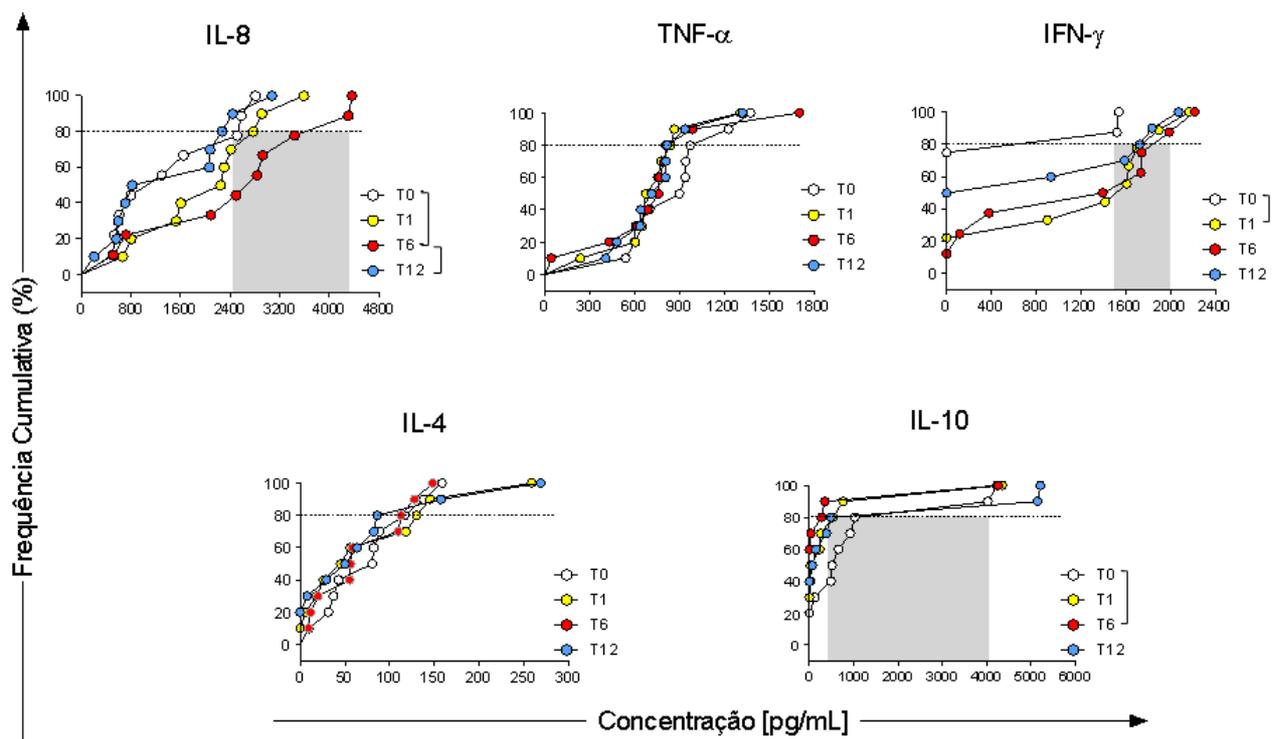


Figura 3 – Frequência cumulativa de cães apresentando diferentes níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania chagasi*. (T0) Grupo de animais não vacinados; (T1) Grupo de animais com 1 mês pós vacinação, (T6) Grupo de animais com 6 meses pós vacinação, (T12) Grupo de animais com 12 meses pós vacinação. Os resultados estão expressos sob a forma de concentração em picogramas/mL (pg/mL) \pm erro padrão por frequência cumulativa (%). Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p \leq 0,05$.

1.3- Análise comparativa da assinatura de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania chagasi*

Para análise comparativa da assinatura de citocinas secretadas por leucócitos do sangue periférico após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania chagasi* foi utilizado primeiramente o cálculo do ponto de corte para todas as citocinas avaliadas para estabelecimento dos cães altos e baixos produtores de citocinas.

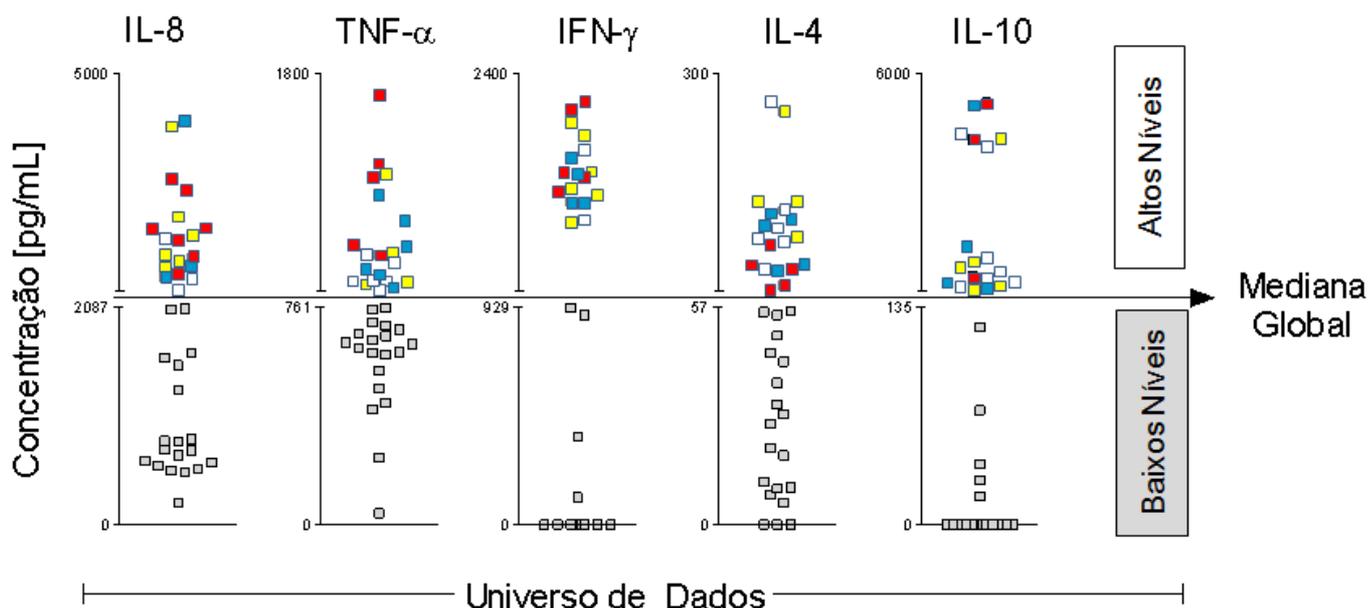
A figura 4A mostra como foi estabelecido este ponto de corte que segrega cães baixo e alto produtores de citocinas, o mesmo foi obtido empregando a mediana global da razão ASL/Controle. Para isto, todos os valores obtidos para cada citocina secretada por leucócitos, de todos os cães foram considerados para a obtenção deste ponto de corte.

Após a determinação do ponto de corte foi realizado a categorização de baixo e alto-produtores de citocinas. Cada quadrado representa o dado de um cão em relação à síntese de uma determinada citocina secretada por leucócito. Os quadrados coloridos (branco, amarelo, vermelho e azul) representam os alto-produtores, uma vez que os valores observados foram acima da mediana global do grupo e os quadrados cinza representam os baixo-produtores, uma vez que os valores observados foram abaixo da mediana global do grupo. No caso de leucócitos IL-8⁺ a mediana foi 2087 pg/mL, TNF- α ⁺ a mediana foi 761 pg/mL, IFN- γ ⁺ a mediana foi 929 pg/mL, IL-4⁺ a mediana foi 57 pg/mL e IL-10⁺ a mediana foi 135 pg/mL.

A figura 4B, mostra a montagem do perfil panorâmico de citocinas de cada cão e cálculo da frequência de alto-produtores de citocinas em cada grupo de estudo. Após a categorização dos animais como alto ou baixo produtores de citocinas, foi feita a compilação dos dados em diagramas com todas as citocinas secretadas. Os retângulos coloridos (branco, amarelo, vermelho e azul) representam alto-produtores de citocinas, os retângulos cinzas representam baixo-produtores de citocinas, cada linha representa um cão do grupo analisado e cada coluna representa a citocina avaliada.

Para o cálculo da frequência percentual de alto-produtores, foram somados os retângulos coloridos de cada coluna, divididos pelo total de animais e multiplicados por 100. Como exemplo, caracterizou-se o cálculo da frequência da citocina IL-8 nos cães não vacinados(T0), no qual 3 é o somatório da coluna e 9 é o número total de cães. Multiplicando por 100, encontra-se uma porcentagem de 33%, que é a frequência de animais no grupo do tempo zero considerados como alto produtores de IL-8.

A



B

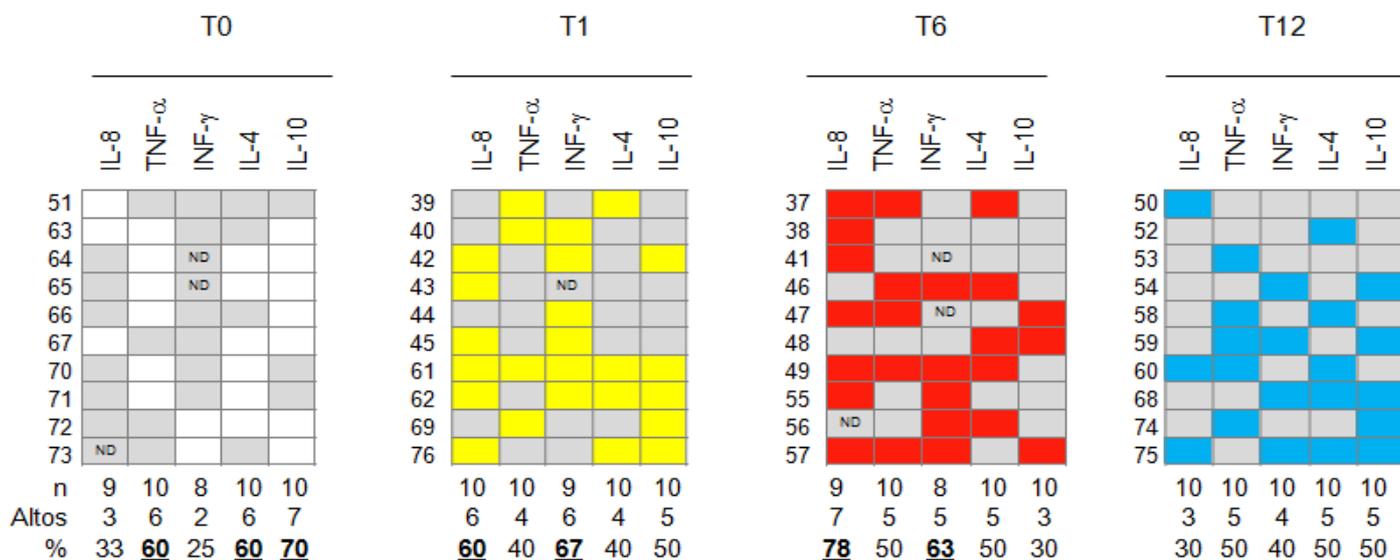


Figura 4 A- Ponto de corte para citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. Os quadrados coloridos representam a população de cães alto-produtores de citocinas (branco, amarelo, vermelho e azul) e os quadrados cinzas representam os baixo-produtores de citocinas. O valor do ponto de corte foi representado pela mediana global. Figura 4 B- Diagramas para cálculo da frequência de cães com altos níveis de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. Os retângulos coloridos (branco, amarelo, vermelho e azul) representam alto-produtores de citocinas, os retângulos cinzas representam os baixo-produtores de citocinas, cada linha representa um cão do grupo analisado, cada coluna representa a citocina avaliada e a sigla ND representa valores não detectáveis.

Na figura 5, foi delineado a assinatura global dos alto-produtores de citocinas de acordo com uma frequência ascendente considerando toda a população dos cães de cada tempo da vacinação (T0, T1, T6 e T12).

Os resultados relativos ao padrão global de citocinas secretadas demonstrou que o grupo de animais não vacinados (T0) possui um perfil com animais com alta produção de IL-4, TNF- α e IL-10. Já o grupo de animais com 30 dias pós-vacinação (T1) e 6 meses pós-vacinação (T6) apresentam um perfil de animais que apresentaram alta produção de citocinas inflamatórias IL-8 e IFN- γ . Sendo que no grupo de animais com um ano pós vacinação (T12), não foi observado cães com alta frequência de produção de nenhuma das citocinas avaliadas neste estudo.

A análise das curvas ascendentes de citocinas revelou que o grupo não vacinado (T0), apresentava um perfil de citocina com característica anti-inflamatória, sendo que a maior expressão foi observada na citocina IL-10 e a menor pela citocina INF- γ , sendo então sua sequência ascendente de citocina : IFN- γ <IL-8<IL-4<TNF- α < L-10. Já os grupo de animais com 30 dias pós-vacinação (T1) e 6 meses pós-vacinação (T6) possuíram um perfil de citocina inflamatório sendo que a maior expressão foi observada nas citocinas IL8 e IFN- γ e as menores expressões foram observadas nas citocinas IL-4 e IL-10, sendo suas sequências ascendentes IL-4<TNF- α <IL-10<IL-8<IFN- γ (T1) e IL-10<IL-4<TNF- α <IFN- γ <IL-8 (T6), respectivamente. Já o grupo de animais com um ano pós vacinação (T12) parece haver um retorno a um perfil anti-inflamatório, sendo IL-8 e IFN- γ , as duas citocinas de menor expressão, sendo sua sequência ascendente IL-8<IFN- γ <IL-4<IL-10<TNF- α .

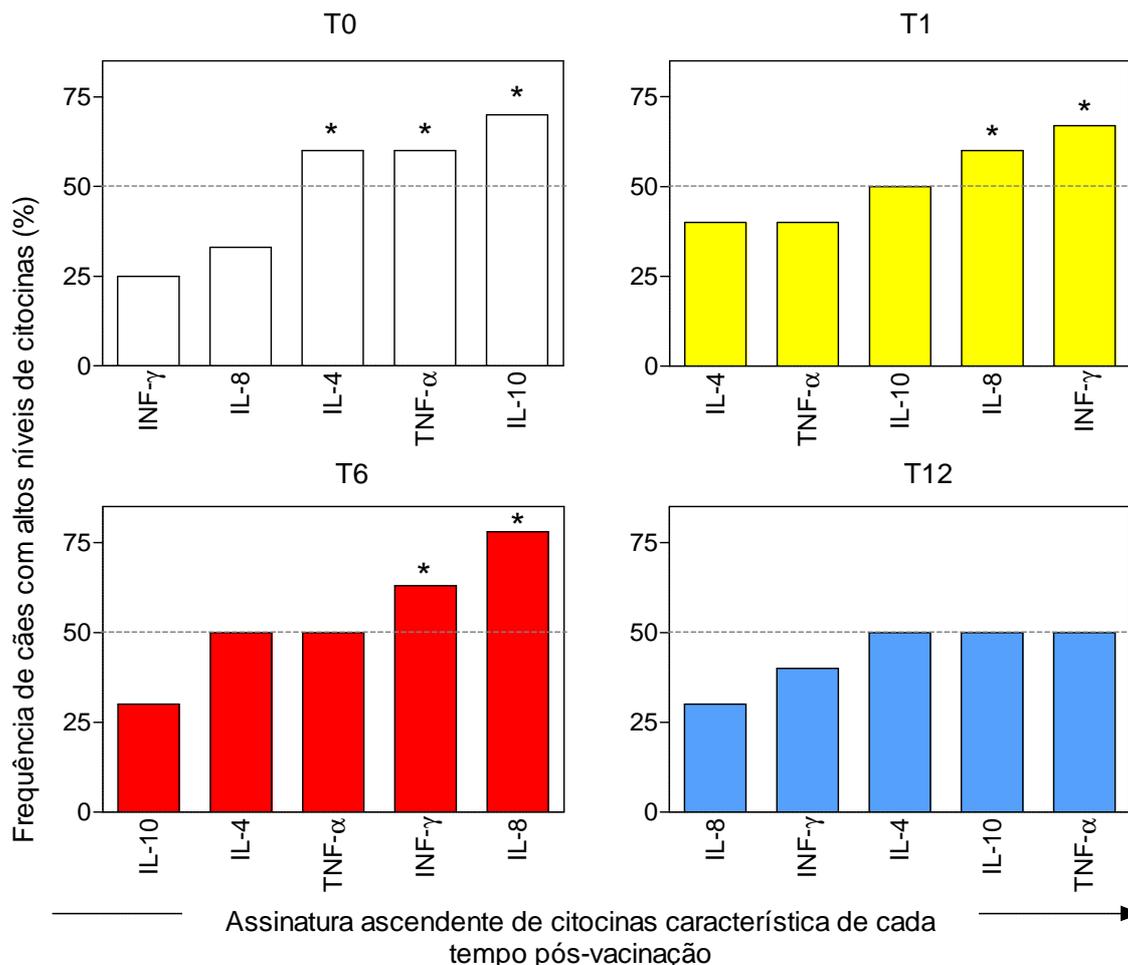


Figura 5 – Assinatura de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. O eixo x está representado pela frequência de cães com altos níveis de citocinas(%) e o eixo y pela assinatura ascendente de citocinas característica de cada tempo pós-vacinação. A linha pontilhada destaca o percentil de 50 usado como referência para análises comparativas. Diferenças significativas foram consideradas quando a frequência de alguma citocina ultrapassou o percentil 50, representada por um *.

A figura 6 mostra a análise comparativa das assinaturas de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. Para esta comparação, foi feita a sobreposição das assinaturas das citocinas de cada tempo pós-vacinação.

A análise da assinatura de citocinas no sobrenadante das culturas de sangue total estimulada com ASL, cães demonstrou que a vacina desencadeou um envolvimento da condição inflamatória da imunidade dos animais (resposta Tipo1), especialmente devido a um aumento de produção de citocinas inflamatórias como IL-8 e IFN- γ nos tempos de 30 dias pós vacinação (T1) e seis meses pós vacinação (T6), e também um decréscimo de IL-10 nestes mesmos tempos quando

comparados ao grupo de animais não vacinados (T0). Por outro lado, a análise da assinatura de citocinas no grupo de cães com um ano pós vacinação (T12) revelou uma queda de citocinas inflamatórias e aumento de reguladoras, sendo detectado um perfil mais semelhante aos cães não vacinados (T0).

A análise comparativa das assinaturas de citocinas destacaram as particularidades da resposta imune mediada por citocinas desencadeadas pelo estímulo *in vitro* em cada tempo pós-vacinal como demonstrado por uma mudança de perfil imunológico no decorrer do tempo pós-vacinal. Enquanto os grupos de animais não vacinados (T0) apresentaram altas frequências de citocinas reguladoras e baixas de inflamatórias e com um ano pós vacinação (T12) apresentaram baixa de inflamatórias, os grupos dos animais com um mês (T1) e seis meses (T6) pós vacinação, são destacados pelos altos níveis de citocinas inflamatórias e baixos níveis de reguladoras.

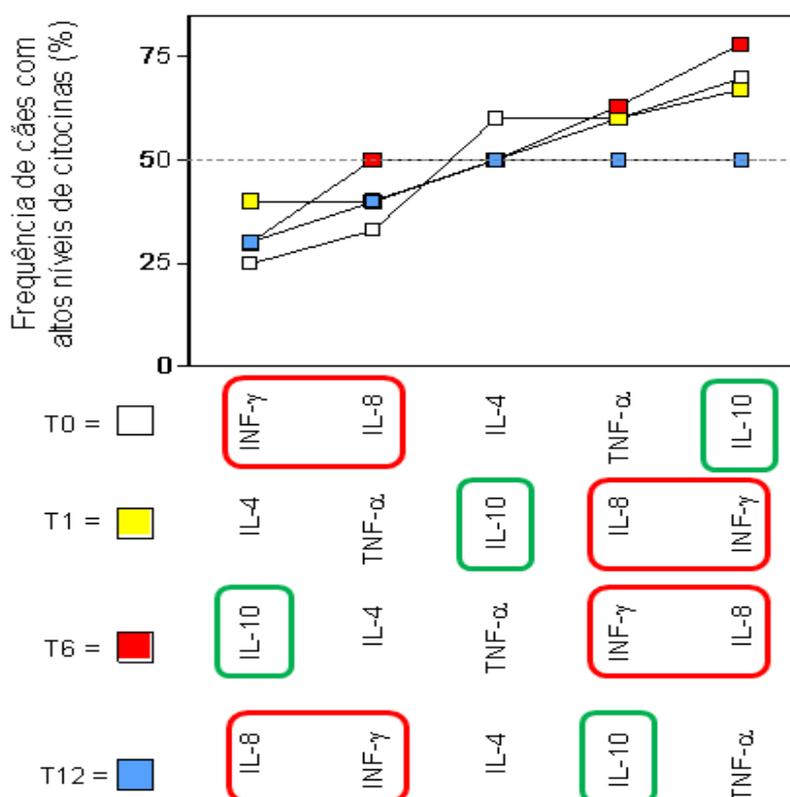


Figura 6: Análise comparativa das assinaturas de citocinas secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. O perfil global de citocinas inflamatórias e reguladoras é apresentado como uma curva ascendente da frequência de cães com altos níveis de citocinas em cada tempo pós-vacinação. A análise comparativa do perfil global de citocinas de cada tempo pós-vacinação foi realizada por sobreposição das assinaturas de citocinas. A linha pontilhada destaca o percentil de 50 usado como referência para análises comparativas.

1.4. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

A Figura 7 mostra os resultados do índice de Linfócitos T citocinas⁺ (ASL/Controle) por período pós vacinação após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

A análise dos dados mostrou um aumento do índice de Linfócitos T IL-17⁺ e T TNF- α ⁺ no grupo de animais após um mês de vacinação (T1) quando comparados ao grupo de animais não vacinados (T0). Foi observado, que este aumento não perdurou no grupo de animais com seis meses (T6) e um ano pós-vacinal (T12), mostrando um retorno aos níveis basais semelhantes aos observados no grupo de animais anterior a vacinação (T0).

A análise dos dados também demonstrou uma queda do índice de Linfócitos T IL-4⁺ no tempo T6 quando comparados ao grupo de animais do tempo T1. Aumento este que não foi observado nos demais tempos pós-vacinal. Já em relação às análises dos índices de Linfócitos T IFN- γ ⁺ e T TGF- β ⁺ nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado os grupos de animais não vacinados e vacinados.

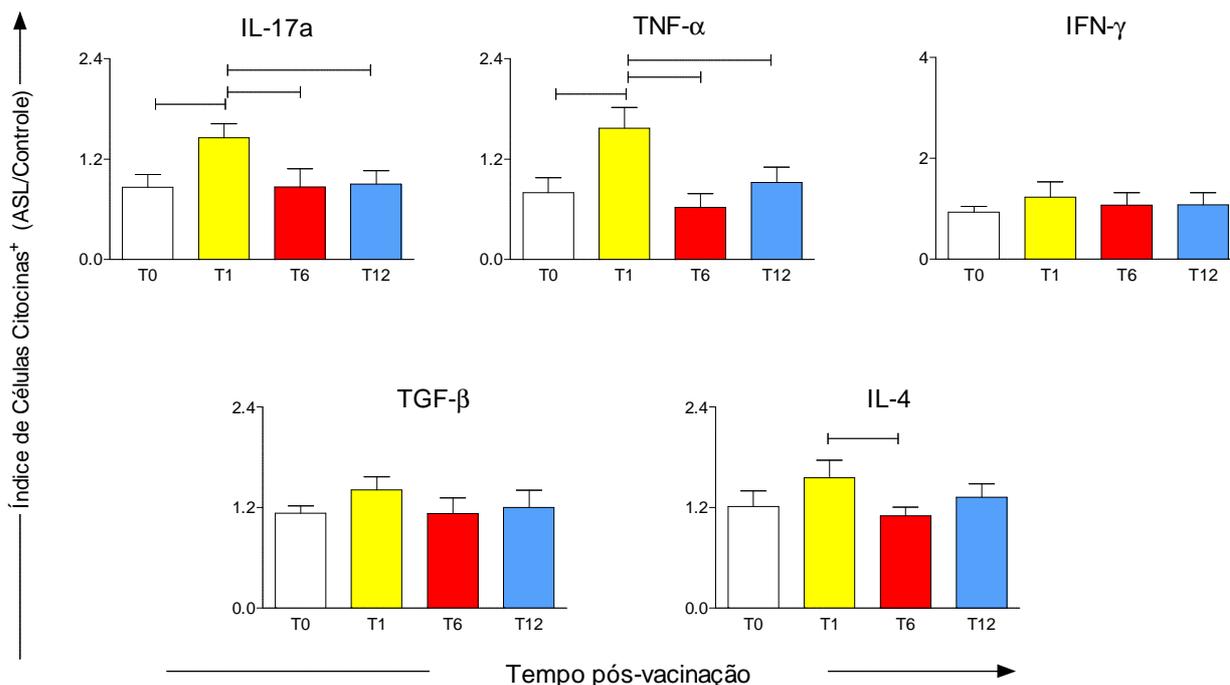


Figura 7- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. (T0) Grupo de animais não vacinados; (T1) Grupo de animais com 1 mês pós vacinação, (T6) Grupo de animais com 6 meses pós vacinação, (T12) Grupo de animais com 12 meses pós vacinação. Os resultados estão expressos sob a forma do índice de células citocinas⁺ por tempo pós-vacinação. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p \leq 0,05$.

1.5. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

A Figura 8 mostra os resultados do índice de Linfócitos T CD4⁺ citocinas⁺ (ASL/Controle) por tempo pós-vacinação sob estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

A análise dos dados mostrou um aumento do índice de Linfócitos T CD4⁺ TNF-α⁺, no grupo de animais após um mês de vacinação (T1) quando comparado ao grupo de animais não vacinados (T0). Foi observado, que este aumento não perdurou no grupo de animais um ano pós-vacinal (T12), mostrando um retorno aos níveis basais semelhantes aos observado no grupo de animais anterior a vacinação (T0).

A análise dos dados também demonstrou um aumento do índice de Linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, no tempo T6 quando comparados ao grupo de animais não vacinados (T0).

Já em relação as análises dos índices de Linfócitos T CD4⁺ IL-17a⁺, T CD4⁺ TGF- β ⁺ e T CD4⁺ IL-4⁺ nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado o grupo de animais não vacinados e vacinados.

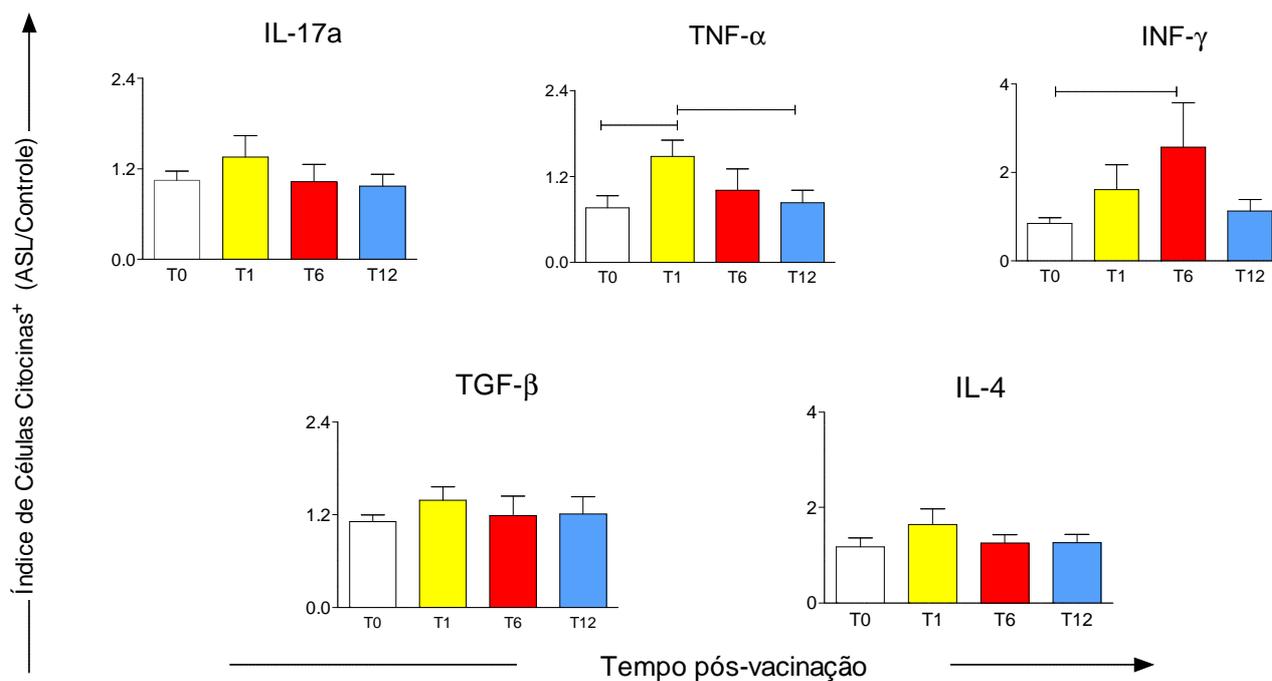


Figura 8- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. (T0) Grupo de animais não vacinados; (T1) Grupo de animais com 1 mês pós vacinação, (T6) Grupo de animais com 6 meses pós vacinação, (T12) Grupo de animais com 12 meses pós vacinação. Os resultados estão expressos sob a forma do índice de células citocinas⁺ por tempo pós-vacinação. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p \leq 0,05$.

1.6. Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

A Figura 9 mostra os resultados do índice de Linfócitos T CD8⁺ citocinas⁺ (ASL/Controle) por tempo pós-vacinação após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

A análise dos dados demonstrou um aumento do índice de Linfócitos T CD8⁺ IL-17a⁺ no grupo de animais após um mês de vacinação (T1) quando comparado ao grupo de animais não vacinados (T0). Foi observado, que este aumento não perdurou no grupo de animais com seis meses (T6) e um ano pós vacinal (T12), mostrando um retorno aos níveis basais semelhantes aos observado no grupo de animais anterior a vacinação (T0).

A análise dos dados também demonstrou uma queda do índice de Linfócitos T CD8⁺ IL-4⁺ no tempo T6 quando comparados ao grupo de animais não vacinados (T0) e ao grupo dos animais do tempo T1.

Já em relação às análises dos índices de Linfócitos T CD8⁺ TNF- α ⁺, T CD8⁺ IFN- γ ⁺ e T CD8⁺ TGF- β ⁺ nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado o grupo de animais não vacinados e vacinados.

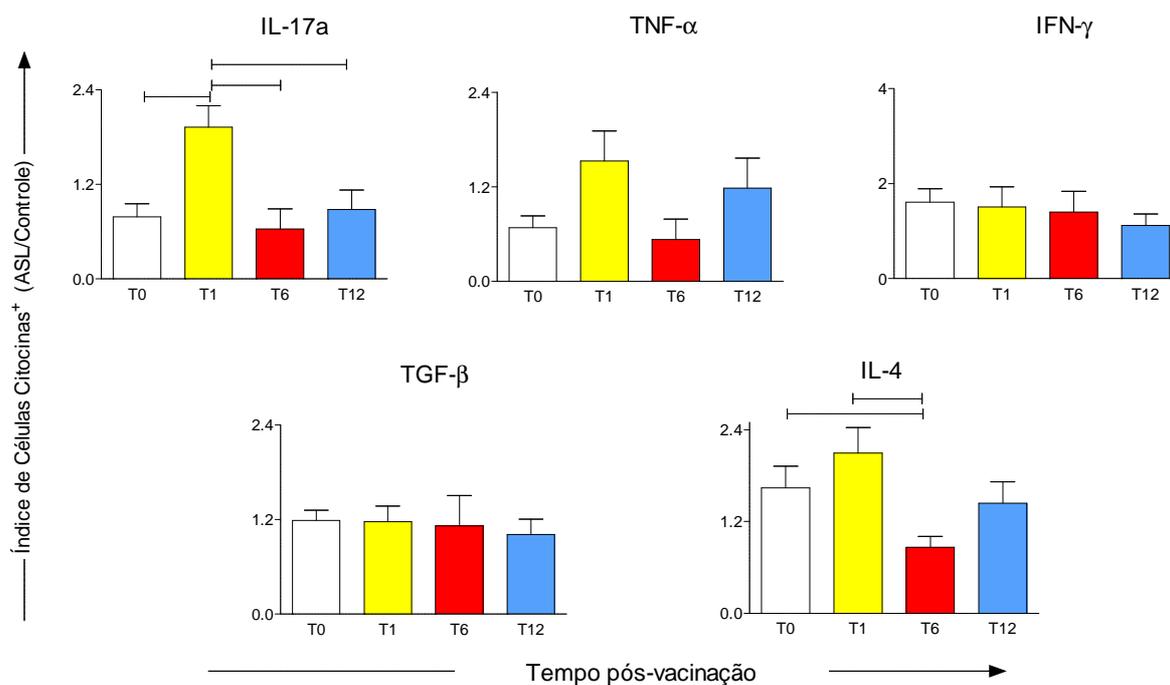


Figura 9- Perfil de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico dos cães vacinados com Leishmune® após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. (T0) Grupo de animais não vacinados; (T1) Grupo de animais com 1 mês pós vacinação, (T6) Grupo de animais com 6 meses pós vacinação, (T12) Grupo de animais com 12 meses pós vacinação. Os resultados estão expressos sob a forma do índice de células citocinas⁺ por tempo pós-vacinação. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando p \leq 0,05.

DISCUSSÃO

Diante da importância da leishmaniose visceral humana como problema de saúde pública é fundamental o desenvolvimento de estratégias de prevenção e terapêuticas que reduzam a prevalência da doença no âmbito mundial. A busca por vacinas que tenham uma forte eficácia contra a leishmaniose visceral tem sido feito por agências e universidades nacionais e internacionais envolvendo vários candidatos promissores [101]. No entanto, estes estudos têm demonstrado resultados controversos ou pouco conclusivos, o que tem incentivado o estudo de novos imunógenos que possam proporcionar uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LVC.

Dentre vários grupos de pesquisa que enfocam vacinas contra LVC, podemos destacar o grupo da UFRJ, coordenado pela professora Clarissa Palatnik, que desenvolveu uma vacina de segunda geração, denominada Leishmune[®]. Após sua aprovação pelo Ministério da Agricultura do Brasil, a Leishmune[®] representa atualmente, uma ferramenta imunoproliférica promissora que poderia ser aplicada em campanhas de controle do calazar canino.

Embora estudos de proteção tenham revelado potencial da Leishmune[®] para o controle da LVC, algumas restrições para o uso deste imunobiológico tem sido apresentadas, principalmente devido a escassez de fundamentação científica acerca das bases celulares e moleculares da imunidade protetora pós-vacinal.

Com o intuito de contribuir nesse amplo contexto de investigação, nos propusemos investigar o perfil de citocinas produzidas por leucócitos circulantes no sangue periférico de animais após vacinação, a fim de analisar seu potencial como imunostimulador de importância para a efetividade vacinal, verificando com estes marcadores a sua duração, avaliando desta forma a necessidade de realizar reforços vacinais em período inferior ou até superior a um ano conforme é recomendado pelo fabricante. Conseguindo obter estes marcadores, os mesmos serão empregados no desenvolvimento de um protótipo capaz de avaliar predição de proteção dos animais vacinados contra LVC, com este ou com outros imunobiológicos utilizados contra LVC.

Foram empregadas metodologias que avaliaram o impacto da imunização dos cães, submetidos a primo-vacinação utilizando a vacina Leishmune[®] no perfil de citocinas intracitoplasmáticas no sangue periférico e de citocinas presentes no sobrenadante. Isto nos permitiu um estudo mais completo e detalhado da resposta imune e também proporcionou confrontar e ampliar o conhecimento acerca da

dinâmica da resposta imune desencadeada pela vacina. Portanto, este estudo além de nos proporcionar um levantamento da resposta imune gerada pela vacinação, contribuiu para a análise da efetividade vacinal de um imunobiológico comercialmente disponível.

Os resultados referentes a cada uma das investigações serão discutidos a seguir, contextualizados com base em aspectos inerentes aos tempos pós-vacinação.

Considerando a complexidade da resposta imunológica que envolve a leishmaniose, buscamos através de diferentes enfoques fazer a caracterização do perfil de resposta imune celular envolvida no processo de imunização de cães contra esta doença. Com este intuito, realizamos um protocolo de imunofenotipagem de células do sangue periférico dos cães após o processo vacinal para avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] no perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas do tipo 1 e do tipo 2 em linfócitos de cães, após a interação do sangue periférico com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* e um protocolo de Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) para avaliar perfil de síntese de citocinas secretada por leucócitos no sobrenadante da cultura do sangue periférico após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

Moléculas na superfície de células hematopoiéticas desempenham um importante papel no seu desenvolvimento e função, servindo como objetos de crescentes avanços no conhecimento sobre o sistema imune. Embora, anticorpos dirigidos para uma ampla variedade de marcadores moleculares de leucócitos humanos e de camundongo sejam disponíveis comercialmente, um repertório ainda restrito encontra-se disponível para os estudos da resposta imune em cães.

Em 1993 o *First International Canine Leucocyte Antigen Workshop* – CLAW [102] foi conduzido com o objetivo de identificar antígenos de leucócitos caninos e anticorpos monoclonais que reconhecessem antígenos homólogos, classificando-os por analogia de acordo com a nomenclatura dos CD humanos e murinos. Desde então, reações cruzadas entre moléculas expressas por linfócitos humanos vêm sendo relatadas em várias publicações [103,104,105]. Atualmente são produzidos anticorpos monoclonais dirigidos a um pequeno conjunto de antígenos de células caninas, capazes de identificar estágios de diferenciação, ativação, migração celular e imunorregulação [106]. A utilização de anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes específicos para moléculas caninas, sua

utilização para imunofenotipagem através da citometria de fluxo, representa uma poderosa ferramenta para estudos imunológicos. Em nosso estudo, empregamos anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 para caracterização de subpopulações celular e anticorpos monoclonais Anti-citocinas (IL-17a, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-4) para marcação de citocinas intracitoplasmáticas em células do sangue periférico submetidas à cultura de sangue total por 48 horas, na ausência ou presença do antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (ASL). Foi também utilizado a técnica de ELISA para determinar os níveis de citocinas (IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) secretadas por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro*.

O hospedeiro imunocompetente é capaz de ativar as respostas inflamatórias inata e adquirida que vão estabelecer o grau de expressão da doença. Primeiramente, os macrófagos são ativados a um estado leishmanicida estimulado por uma resposta de células T auxiliares do tipo 1 (Th1). Esta resposta envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs), células T CD4⁺ e uma grande liberação de citocinas pró-inflamatórias [17].

No nosso estudo, foi observado que o grupo de animais com 6 meses após vacinação com a Leishmune[®] apresentou um predomínio de resposta pró-inflamatória mediado por IFN- γ e IL-8 quando analisadas as citocinas secretadas por leucócitos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*. Sendo que o IFN- γ , aumentou após 1 mês da vacinação contra LVC.

As citocinas reguladoras IL-4, IL-10 e a IL-13 são citocinas associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta do tipo 1, inibindo macrófagos e, assim, favorecendo a infecção intracelular. Dados de um estudo realizado por Murray *et al*, 2002 demonstram que a ausência da IL-10 favorece a ativação da resposta do tipo 1, promovendo a eliminação do parasito e um sinergismo da resposta imunológica com a quimioterapia em infecções agudas [18].

No sítio da infecção, há migração de neutrófilos que iniciam a fagocitose dos parasitos. Uma vez interiorizados, se inicia um processo de eliminação do parasito pelas enzimas proteolíticas e por espécies reativas de oxigênio produzidas no interior dos lisossomos que se fundem com os fagossomos formando os fagolisossomos. Neste processo, ocorre ainda a produção de IL-8, essencial para a atração de novos neutrófilos. Da mesma forma, macrófagos são atraídos ao local

da infecção, fagocitam o parasito e iniciam a produção de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-18 e IL-12 e de metabólitos tóxicos do oxigênio, como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio e a produção de óxido nítrico.

Em nosso estudo, o perfil de citocinas secretados por leucócitos do sangue periférico dos cães imunizados quando avaliado através da frequência cumulativa (%) de cães após 6 meses, mostrou uma queda de IL-10 quando comparado aos animais não vacinados, corroborando com um perfil protetivo, juntamente com aumento de IL-8 e IFN- γ que também foi observado. Os resultados demonstraram que o aumento da IL-8 não foi duradouro, pois os animais com 12 meses pós vacinação apresentaram títulos semelhantes aos observados nos animais não vacinados. As citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNF- α e IFN- γ) e também as reguladoras (IL-4 e IL-10) secretadas por leucócitos periféricos no grupo de animais 1 ano após vacinação não apresentaram diferença significativa em relação aos animais não vacinados.

A análise do perfil de assinaturas de citocinas dos leucócitos dos cães confirma os resultados anteriores, pois demonstra que a vacina desencadeia uma resposta com perfil de imunidade inflamatório dos animais, especialmente devido a um aumento de produção de citocinas como IL-8 e IFN- γ no grupo dos animais com um e seis meses pós vacinação, juntamente com um decréscimo significativo de IL-10 seis meses pós vacinação quando comparados ao grupo de animais não vacinados. Por outro lado, a análise do perfil de assinatura de citocinas no grupo de cães com dose meses pós vacinal revelou uma queda de citocinas inflamatórias e aumento de reguladoras, sendo detectado um perfil mais semelhante aos do grupo de animais não vacinados.

A análise comparativa do perfil das assinaturas de citocinas destacaram as particularidades da resposta imune mediada por citocinas desencadeadas pelo estímulo *in vitro* em cada tempo pós-vacinal, esta análise demonstra uma mudança de perfil imunológico no decorrer do tempo pós vacinal, enquanto os grupos de animais não vacinados apresentaram altas frequências de citocinas reguladoras e baixas de inflamatórias e com um ano pós vacinação apresentaram baixa de inflamatórias, os grupos dos animais com um mês e seis meses pós vacinação, mostram altos níveis de citocinas inflamatórias e baixos níveis de reguladoras.

Embora seja consenso que a morte da *Leishmania* por fagócitos seja o ponto crucial da resolução da infecção, estudos realizados em modelo experimental têm demonstrado que a ativação efetiva e persistente de macrófagos requer um padrão de citocinas derivadas de células da imunidade adaptativa, para o controle efetivo da infecção. Além disso, cabe ressaltar a importância da imunidade adaptativa no contexto da memória pós-vacinal e o seu papel fundamental no direcionamento de uma imunidade inata pós-vacinal mais efetiva [45]. Células T CD4⁺ desempenham um papel decisivo no estabelecimento da resposta imune específica na leishmaniose, pois podem mediar, através da produção de diferentes citocinas, mecanismos efetores envolvidos no controle e progressão da infecção [107]. Os linfócitos T auxiliares, que expressam moléculas CD4 em sua superfície, reconhecem peptídeos antigênicos no contexto de células apresentadoras de antígenos (APC) [108] e uma vez ativadas, promovem conexões imunológicas entre eventos da imunidade humoral, via interação T/B bem como da imunidade celular inata (via fagócitos e APCs) e adaptativa (via células T CD8⁺) [45].

Nosso estudo visou caracterizar a contribuição da imunidade adaptativa no contexto da vacinação anti-LVC, para isto, realizamos um estudo do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T periféricos dos cães vacinados após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

A análise de citocinas do tipo 1 tem sido considerada como um pré-requisito para compor análises de imunogenicidade antes e após o desafio experimental com *L. chagasi* em ensaios clínicos vacinais anti-LVC [47]. Neste sentido, os resultados dos índices de células T citocinas⁺ demonstraram um aumento de células T IL-17⁺ e T TNF- α ⁺ no grupo de animais com 30 dias de vacinação quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Alguns estudos relacionam estas citocinas a um perfil de resistência na LVC [109, 110] visto que são citocinas pró-inflamatórias.

Como já citado, o hospedeiro imunocompetente é capaz de ativar as respostas inflamatórias inata e adquirida que vão estabelecer o grau de expressão da doença. Esta resposta envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígeno (APCs), células T CD4⁺ e uma grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- γ , TNF- α . Esta mesma resposta

previne a manifestação da doença após um estado latente e o estabelecimento de fase crônica [17].

Em nossos resultados, ao analisarmos as subpopulações separadamente, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, vimos que a fonte de células T TNF- α ⁺ foram de células T CD4⁺, ao passo que a fonte de células T IL-17⁺ foram de células T CD8⁺.

Os resultados mostraram que no grupo de animais com 6 meses e 1 ano após a vacinação com Leishmune[®] estas citocinas (IL-17a e TNF- α), tiveram um decréscimo quando comparadas ao grupo de animais com 30 dias pós vacinação, voltando ao estado basal, semelhante ao perfil encontrado nos animais controle. Junto a isto, os resultados também mostraram uma redução do índice de células T expressando IL-4⁺ no 6^o mês pós vacinal quando comparados ao grupo de animais com 30 dias pós vacinal. Podemos observar que a subpopulação LT CD8⁺, é que foi a fonte desta citocina. É sabido, que as citocinas reguladoras, como por exemplo a IL-4, são associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta do tipo 1, inibindo atividade de macrófagos e, assim, favorecendo a infecção intracelular [18]. Por isso a diminuição desta citocina poderia ser um indicador preditivo de sucesso da imunização de cães contra LVC. Muitos estudos indicam que a resposta imunológica Th2 predomina durante uma infecção humana aguda num quadro de leishmaniose, com a supressão da reatividade de células T, predominância das citocinas IL-4 e IL-10 em relação ao IFN- γ e a ativação de células B policlonais, resultando em uma hipergamaglobulinemia [26]. O envolvimento de Th1 e Th2 na proteção e exacerbação da doença, respectivamente, tem sido demonstrado em modelo murino de leishmaniose cutânea [27] e visceral [28], principalmente porque a IL-4 pode regular a ação de macrófagos [29]. No entanto, parece possível que, em alguns casos de leishmaniose visceral, um padrão misto Th1 e Th2 seja ativado, conforme revelado pelos altos níveis simultâneos de IFN- γ e de IL-4 detectados em camundongos [30] e em cães [31]. Nestes casos, a IL-4 não apresentaria um padrão imunoregulatório [32].

Quando analisados juntos, estes dados fornecem evidências da existência de uma dicotomia da IL-4. Esta citocina pode ter a capacidade de estimular a diferenciação de células dendríticas em células produtoras de IL-12 estimulando a resposta Th1 e a resistência à infecção. Ao contrário, sua produção por células T

CD4⁺ pode estar relacionada com a susceptibilidade e o direcionamento da resposta para Th2 [26,34].

Nossos resultados demonstraram um importante aumento de INF- γ em células T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *L.chagasi*. Estes resultados se parecem com os obtidos por Holzmüller *et al.* (2005) e Lemesre *et al.* (2007). Deste modo, estes autores relataram que macrófagos infectados com *L. infantum* de cães imunizados com a vacina LiESAp que foram mantidos em co-cultivo com linfócitos totais, apresentaram maiores níveis de INF- γ no sobrenadante de cultura e conseqüentemente, melhor desempenho imunológico em controlar a carga parasitária *in vitro*. Além disso, demonstraram que a atividade microbicida resultava em apoptose intracelular de amastigotas. Estes dados foram analisados com 72 horas após infecção *in vitro*.

Araújo *et al.* (2009; 2011) observaram que o processo de vacinação com a Leishmune® induziu aumento do percentual de linfócitos T INF- γ ⁺, sendo que a subpopulação de Linfócitos T CD4⁺ foi a principal fonte produtora desta citocina. Neste contexto, os níveis de INF- γ obtidos no presente trabalho, foram mais expressivos nas culturas com células T CD4⁺. Além disso, foram semelhantes aos encontrados por Rodrigues *et al.* (2007) em que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães foram capazes de produzir INF- γ quando estimuladas com antígeno solúvel de *L. chagasi*, havendo redução da taxa de macrófagos infectados. Por outro lado, Rodrigues *et al.* (2009) através de estudo com PBMC de cães, estimulado com *L. chagasi* e co-cultivado com macrófagos infectados, obteve correlação positiva entre níveis de mRNA de INF- γ e IL-4 e carga parasitária nas culturas estimuladas.

Em relação à participação efetiva de linfócitos T CD4⁺ no direcionamento da resposta imune, vários estudos têm demonstrado que estas células secretam uma variedade de citocinas e que estas desempenham um papel importante no sentido do favorecimento da ativação de eventos da imunidade celular e humoral. Assim, o direcionamento da resposta imune para um padrão de participação efetiva de linfócitos B, linfócitos T CD8⁺, bem como células da imunidade inata, parece ser consequência direta do perfil do microambiente de citocinas. Dependendo do tipo de citocina produzida pelas células T CD4⁺, diferentes mecanismos promotores da imunidade inata e adaptativa poderiam ser disparados. Em um microambiente de

predomínio de citocinas do tipo 1 (como IL-12 e INF- γ) observa-se o favorecimento de mecanismos da resposta imune celular. Por outro lado, num microambiente com predomínio de citocinas do tipo 2 (como IL-4 e IL-10) parece existir um favorecimento de eventos da síntese de anticorpos pelas células B [115].

A ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com macrófagos caninos infectados com *L. infantum*, foi demonstrada pela primeira vez em 1994. Neste estudo, os linfócitos de cães assintomáticos foram capazes de produzir elevados níveis de IFN- γ , ao passo que as células de cães sintomáticos não tinham esta habilidade. No entanto, os autores relataram que, em alguns animais, as células T CD4⁺ também eram capazes de lisar macrófagos, entretanto, sem especificarem as vias pelas quais a lise desencadeada por esta subpopulação de linfócito poderia ocorrer [109,116].

Segundo Araújo *et al*, (2011) os resultados referentes ao padrão de síntese de citocinas confirmaram o perfil seletivo da resposta imune desencadeada pela Leishmune[®], com de síntese de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e balanço favorável da síntese de IFN- γ sobre IL-4 por linfócitos T totais. Esses dados, assim como os encontrados no nosso estudo, demonstraram a habilidade deste imunobiológico em desencadear alterações fenotípicas capazes de induzir mecanismos imunoprotetores no âmbito da imunoprofilaxia da LVC.

Ainda segundo Araújo *et al*, (2011) numa abordagem adicional sobre o potencial imunogênico da Leishmune[®] na resposta imune celular, um fator importante seria avaliar a capacidade do imunógeno de induzir a produção de óxido nítrico (NO), que é um potente agente leishmanicida. O NO é um mediador biológico sintetizado por diferentes tipos celulares, pela ação de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS), que incluem as isoformas nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) - conhecidas como cNOS (constitutivas) - e a iNOS (induzida). A ativação do sistema imune e o estabelecimento de um perfil de caráter inflamatório está geralmente associado ao aumento na expressão de iNOS. O mecanismo de ativação e o papel funcional de iNOS encontra-se bem estabelecidos em macrófagos de camundongos e humanos. Entretanto, os eventos envolvidos na atividade de iNOS em monócitos/macrófagos caninos ainda necessita ser esclarecido (21,111,117). Em humanos, uma forte expressão de iNOS tem sido descrita em tecidos de indivíduos infectados por *L. donovani* [118].

Os autores sugerem que a indução da expressão de iNOS seja regulada primariamente em nível de transcrição e modulada por várias citocinas ou produtos do parasito. Em geral, IFN- γ , IL-2 e TNF- α são considerados potentes indutores da expressão de iNOS. Por outro lado, IL-4, IL-10 e TGF- β , são considerados supressores da expressão de iNOS [119,120,121]. Vouldoukis *et al.* (1997), demonstraram que a IL-10 é um potente inibidor da geração de NO por macrófagos humanos infectados com *L. major* ou *L. infantum*. Além disso, os autores demonstraram que a função da IL-10 aumentava quando associada a IL-4. Considerando a importância do NO no controle do parasitismo de macrófagos por *Leishmania*, alguns autores correlacionam os eventos de proteção na leishmaniose à maior expressão de iNOS e conseqüentemente uma produção mais elevada de NO [123,124].

Para avaliar a produção de NO por monócitos de animais vacinados com a Leishmune[®], Araújo *et al.*, (2011) determinou o NO indiretamente através da avaliação dos níveis de nitrito em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos animais antes e após a vacinação. Os resultados demonstraram que o grupo de animais imunizados com essa vacina apresentou um aumento significativo de produção de nitrito. Este resultado associa-se de forma interessante com o fato do grupo de animais do tempo com um mês e seis meses pós vacinação apresentarem um aumento na produção de IFN- γ por leucócitos periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *L. chagasi*, sendo que no sexto mês a fonte principal foram linfócitos T CD4⁺.

A estreita relação entre a produção óxido nítrico e a síntese de IFN- γ por culturas de células de cães vacinados com a Leishmune[®], associado aos resultados anteriores obtidos no nosso estudo, que demonstram seletividade do envolvimento de linfócitos T, nos dá suporte para sugerir que os animais até 6 meses após vacinação com a Leishmune[®] apresentam os mecanismos imunológicos compatíveis com desenvolvimento de proteção contra infecção por *Leishmania*. Ao passo que, com 1 ano após vacinação, os animais já não apresentam mais indícios de resposta imunológica de proteção, pois o perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células T (tanto T CD4⁺ quanto T CD8⁺), apresentando níveis basais semelhantes aos animais não vacinados, desta forma estes animais necessitariam de um reforço vacinal.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo permitiram identificar o perfil de citocinas produzidas por leucócitos circulantes no sangue periférico de animais em diferentes tempos pós imunização com a vacina Leishmune[®] através da busca por marcadores biológicos que identificam um perfil de resposta imune protetora em cães vacinados, que sejam indicativos de eficácia vacinal. E além disso, através destes biomarcadores caracterizados, foi possível iniciar o desenvolvimento de um kit protótipo para predição de imunoproteção, que poderá futuramente ser empregado em cães já imunizados com vacinas comercialmente disponíveis contra LVC.

Embora, nosso estudo tenha fornecido informações relevantes acerca do potencial imunogênico da Leishmune[®] e do tempo de duração da imunização dos cães pela vacina, acreditamos na importância da continuidade deste e de outros estudos, no sentido de gerar informações importantes que constituem ainda grandes lacunas no entendimento da resposta imune no contexto da imunoprofilaxia da LVC. Assim, temos como perspectivas o desenvolvimento e validação do kit protótipo que possa ser utilizado para predição de imunoproteção em animais vacinados. Vale destacar que este kit poderia também ser empregado para auxiliar a seleção de candidatos vacinais contra LVC, proporcionando a redução dos custos para a experimentação em cães, uma vez que os experimentos com este modelo, em ensaios clínicos vacinais convencionais, frequentemente ultrapassam os 360 dias de experimentação.

EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO

As principais evidências que embasam nossa conclusão geral estão listadas abaixo:

- 1) A análise da assinatura de citocinas secretadas pelos leucócitos dos cães vacinados com Leishmune®, demonstrou que a imunização foi capaz de desencadear um perfil de resposta pró-inflamatória (perfil tipo 1) nos animais, especialmente devido a um aumento de produção de citocinas como IL-8 e IFN- γ em cães com um e seis meses pós vacinação, e também um decréscimo significativo de IL-10 nos cães com 6 meses pós vacinação quando comparados ao grupo de animais não vacinados.
- 2) A análise da assinatura de citocinas secretadas pelos leucócitos dos animais do com um ano pós vacinação revelou uma diminuição de citocinas inflamatórias que haviam aumentado no sexto mês, sendo detectado um perfil mais semelhante aos cães não vacinados.
- 3) A análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T periféricos após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* revelou também um predomínio de resposta pró-inflamatória no grupo de animais com um mês de vacinação pelo aumento do índice de células T IL-17a⁺ e T TNF- α ⁺ quando comparados ao grupo de animais não vacinados.
- 4) A análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células T periféricas após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* mostrou um predomínio de resposta pró-inflamatória sobre a regulatória no grupo de animais com seis meses de vacinação, pois os dados demonstraram uma queda do índice de células T IL-4⁺ quando comparados ao grupo de animais com um mês após vacinação. E especificamente diminuição no índice de células T CD8⁺ IL-4⁺, aos seis meses pós vacinação, quando comparado ao grupo de animais não vacinados e ao grupo de animais com um mês pós vacinação.
- 5) Novamente a análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células T periféricas após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

revelou um predomínio de resposta pró-inflamatória no grupo de animais com seis meses de vacinação, visto que os resultados demonstraram aumento no índice de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ no grupo de animais com seis meses pós vacinação quando comparado ao grupo de animais não vacinados.

- 6) No grupo de cães com um ano após vacinação, não foi encontrada nenhuma diferença significativa em relação ao perfil de citocinas do grupo de cães não vacinados, sugerindo retorno, das alterações observadas ao sexto mês, aos níveis basais após um ano.

As evidências supracitadas nos levam a concluir que o processo vacinal promove o desenvolvimento de um perfil de resposta imune celular sugestivo de induzir imunoproteção aos cães vacinados. Porém, fica claro que até 6 meses após vacinação, o grupo de animais permanece com um perfil de ativação de mecanismos imunobiológicos efetivos contra antígeno solúvel de *L. chagasi*. Por sua vez, o grupo de animais com 1 ano pós vacinação retornam à um perfil de biomarcadores basal semelhante ao grupo dos animais não vacinados, o que nos permite inferir que seja necessário o reforço vacinal neste período.

A metodologia proposta, de desenvolvimento de um KIT protótipo preditivo de imunoproteção em cães vacinados com a Leishmune®, mostrou-se factível e a mesma será empregada em novos estudos utilizando outros imunobiológicos para confirmar sua viabilidade e aplicabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MACHADO-COELHO, G.L.; ASSUNÇÃO, R.; MAYRINK, W.; CAIAFFA, W.T. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *Int. J. Epidemiol.* 28, 982-989. 1999.
2. RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Para State, with particular reference to the role of *Psychodopygus welcome* as the vector of *Leishmania brasiliensis brasiliensis* in the Serra dos Carajás. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 353-359. 1987
3. PEARSON, R.D.; DE QUEIROZ SOUZA, A. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 22, 1–13. 1996.
4. MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366, 1561–1577. 2005.
5. CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; SOTO, M.; FRESNO, M.; REQUENA, J.M. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit Vectors* 4, 150. 2011.
6. LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 569-596. 1983.
7. ROGERS, D.J. The dynamics of vector-transmitted diseases in human communities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 321, 513-539. 1988.
8. ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523-532. 1996.
9. CHOUDHURY, N.; SAXENA, N.B. Visceral leishmaniasis in India brief review. *J. Commun. Dis.* 19, 332-340. 1987.
10. LAINSON, R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania chagasi* Cunha in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 63, 134-145. 1988.
11. RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol. Today.* 16, 292-297. 2000.
12. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318. 2004
13. DUJARDIN, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol.* 22, 4–6. 2006.
14. MAIA-ELKHOURY, A.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Publica* 24, 2941–2947. 2008.
15. BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 106, 315–324. 2002.

16. Ministério da Saúde. Letalidade de Leishmaniose visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2009 http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/4_lv_letalidade_14_10_10.pdf (acesso em 20 dezembro de 2012).
17. STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D.L.; GLAICHENHAUS N.; WU, C.Y.; SEDER, R.A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/ effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97,8427-8432. 2000.
18. MURRAY, Y.H.W.; LU, C.M.; MAUZES.; FREEMAN, N.S.; MOREIRA A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.* 70, 6284-6293. 2002.
19. BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 28, 121-134. 1998.
20. STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev. Microbiol.* 28, 187-248. 2002.
21. MOSSALAYI, M.D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol. Today.* 15, 342-345. 1999.
22. MATTNER, F.; ALBER, G.; MAGRAM, J.; KOPF, M. The role of IL-12 and IL-4 in *Leishmania major* infection. *Chem. Immunol.* 68, 86-109. 1997a.
23. MATTNER, F.; DI, P.K.; ALBER, G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 65, 4378-4383. 1997b.
24. WILSON, M. E.; MEINSTOCK, J.V. Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *L. chagasi*. *Methos* 9, 248-254. 1996.
25. WILSON, M.E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B.L.; MENTE, K.A. & MCGOWAN, S.E. The important of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 161: 6148-6155. 1998.
26. KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.J. & KEMP M. The cell response in human leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 65: 105-108. 1999.
27. HEINZEL, F. P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J. COFFMAN, R.L. & LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp. Med.* 169: 59-72. 1989.

28. RHEE, E.G.; MENDEZ, S.; SHAH, J.A.; KIRMAN, J.R.; TURON, T.N.; DAVEY, D. F.; DAVIS, H.; COLER, R.N.; SACKS, D.L. & SEDER, R.A. Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and protection against leishmania major infection. *J. Exp. Med.* 195: 1565-1573. 2002.
29. HAMILTON, T.A.; OHMORI, Y.; TEBO, J. M. & KISHORE, R. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathobiology* 67: 241-244. 1999.
30. 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* 20, 59-66. 2001.
31. RAMIRO, M.J.; ZARATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A. LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and *vaccinia* recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21: 2474-2484. 2003.
32. KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4⁺ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immunol. Today* 17: 13-16. 1996.
33. CILLARI, E.; VITALE, G.; ARCOLEO, F.; D'AGOSTINO, P.; MOCCIARO, C.; GAMBINO, G.; MALTA, R.; STASSI, G.; GIORDANO, C. & MILANO, S. In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine* 7, 740-745. 1995.
34. MELBY, P.C.; YANG, Y.Z.; CHENG, J. & ZHAO, W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immunol.* 66: 18-27. 1998.
35. REINER, N.E.; NG, W.; MCMASTER, W.R. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J. Immunol.* 138, 1926-1932. 1987.
36. DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Res. Immunol.* 149, 689-692. 1998.
37. MENDONÇA, S.C.; RUSSEL, D.G.; COUTINHO, S.G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). *Clin. Exp. Immunol.* 83, 472-478. 1991.
38. LO, S.K.; BOVIS, L.; MATURA, R.; ZHU, B.; HE, S. LUM, H.; TURCO, S.J.; HO, J.L. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intracellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol.* 160, 1857-1865. 1998.

39. HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.; Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332-334. 2002.
40. GUILPIN, V.O.; SWARDSON-OLVER, C.; NOSBISCH, L. TITUS, R.G. Maxadilan, the vasodilator/ immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol.* 24, 437-446. 2002.
41. CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123: 399-410, 2006.
42. SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis- current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* 123, 345- 352. 2006.
43. TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *J Trop Med Hyg.* 52:287–292,1995.
44. PALATNICK-DE-SOUZA, C.B.; SANTOS W.R.; FRANCA-SILVA,J.C.; DA COSTA, R.T.; BARBOSA REIS,A.; PALATNICK, M.; MAYRINK, W.; GENARO,O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *J. Trop. Med.Hyg.* 65:510–517,2001.
45. ARAÚJO M.S.; ANDRADE, R. A.; SATHELER-AVELAR,R.; MAGALHAES C.P.; CARVALHO, A. T.; ANDRADE, M.C.; CAMPOLINA, S.S.; MELLO, M.N.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W. REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.; ROCHA, L.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunophathol.* 141: 64-75, 2011.
46. QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir host and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–1934. 2009.
47. REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J.; Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 26 341–349. 2010.
48. MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO,S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD, Jr.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, Jr. F. B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral *Leishmaniasis* in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1997-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 80: 349-357, 1985.
49. GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumineantimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.,* 86: 613, 1992.
50. GRAMICCIA, M. and GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180. 2005.

51. ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. DE O.; VITORIANO-SOUZA, J.; VITAL, W. C.; BRAGA, S. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; DE LANA, M.; GONTIJO, N. F.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *PLOS ONE* 7 Issue 11 e49780. 2012.
52. GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Present status of antileishmanial vaccines. *Mol. Cell. Biochem.* 253(1-2):199–205, 2003.
53. CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5(11):873–882, 2007.
54. PALATNICK-DE-SOUZA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 26(14):1709–1724. 2008.
55. SALLES-GOMES, L. Intradermo-reação de Monte Negro na Leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-Medico.* 49: 5-15, 1939.
56. PESSOA, S.B.; PESTANA, B.R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. *Rev. Biol. Hig.* 10(2): 112-118, 1940.
57. MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA J.C.; DA COSTA, R.T.; TAFURI, W.L.; ET AL. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 695–697. 1996.
58. LASRI, S.; SAHIBI, H.; SADAK, A.; JAFFE, C.L.; RHALEM, A. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res* 30:441–449. 1999.
59. PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D.D.; MITOLO, V.; ET AL. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 24: 187–195. 2001.
60. GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B.M.; ET AL. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25: 7674–7686. 2007.
61. GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B.M.; ET AL. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26: 623–638. 2008.
62. GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B.; DA SILVEIRA-LEMOES, D.; MARTINS-FILHO, O.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ET AL. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci* 85: 106–112. 2008.

63. ARAUJO, M.S.; DE ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; *ET AL.* T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine* 27: 1008–1017. 2009.
64. ARAUJO, M.S.; DE ANDRADE, R.A.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; *ET AL.* Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26: 2211–2224. 2008.
65. SANTOS, W.R.; DE, L.V.; DE SOUZA, E.P.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PLATINIK DE SOUSA, C.B. Saponins, IL-12 and BCG adjuvante in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21, 30-43. 2002.
66. CRUZ, A.; COBURN, C.M.; BEVERLEY, A.S. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.,U.S.A*, 88, 7171-7174, 1991.
67. XU, D.; LIEW, F.Y. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine*, 12: 1534-1536, 1994.
68. ULMER, J.B.; SADOFF, J.C.; LIU, M.A. DNA Vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*,8: 531-536, 1996.
69. HANDMAN, E.; NOORMOHAMMADI, A.H.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.; SJOLANDER, A. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*, 18: 3011-3017, 2000.
70. GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*,18:927-974, 2000.
71. MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, W.; POINTET, P.; VOULDOUKIS, I. Efficacité de la vaccination de la souris C57Bl/6 contre l'infection par différences espèces de *Leishmania*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 301:803-806, 1985.
72. FROMMEL, D.; OGUNKOLADE, B. W.; VOULDOUKIS, I.; MONJOUR, L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice. *Infection and Immunity*, 56:843, 1988.
73. OGUNKOLADE, B. V.; VOULDOUKIS, I.; FROMMEL, D.; DAVOUST, B.; RHODES-FEUILLETTE, A.; MONJOUR; L. Immunization of dogs with a *Leishmania infantum* – derived vaccine. *Veterinary Parasitology*, 28: 33-41, 1988.
74. DUNAN, S.; FROMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B.W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. & THE PHOCEAN VETERINARY STUDY GROUP ON VISCERAL LEISHMANIASIS. Vaccination trial against canine visceral *Leishmaniasis*. *Parasite Immunology*, 11: 397-492, 1989.

75. MEDONÇA, S.C.; RUSSEL, D.G.; COUTINHO, S.G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). *Clin. Exp. Immunol.* 83, 472-478. 1991.
76. GENARO, O.; DE T.; DA COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.; AFONSO, L.C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin. Dermatol.* 14, 503-512. 1996.
77. MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD, Jr.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, Jr. F.B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 349-357, 1985.
78. MAYRINK, W.; SANTOS, G.C.; TOLEDO, V.P.; GUIMARÃES, T.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; GENARO, O. & DA COSTA C.A. Vaccination of C57/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev. soc.Bras.Med. Trop.* 35: 125-132. 2002.
79. VITORIANO-SOUZA, J.; REIS, A.B.; MOREIRA, N.D.; GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R. ET AL. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine* 26: 3922–3931. 2008.
80. WEBB J.R.; KAUFMAN D.; CAMPOS-NETO A.; REED S.G. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis, *J. Immunol.* 157: 5034-5041, 1996.
81. SKEIKY, Y.A.W.; GUDERIAN, J.A.; BENSON, D.R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; KUBIN, M.; BADARO, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a th1-type cytokines profile and produce interleukin 12. *J. Exp. Med.*, 181: 1527-1537, 1995.
82. FUJIWARA, R. T.; VALE, A. M.; FRANÇA DA SILVA, J.C ; COSTA, R.T. ; QUETZ, J. S.; MARTINS FILHO, O.A.; REIS, A.B.; OLIVEIRA, R.C.; MACHADO-COELHO, G. L.; BUENO, L.L.; BETHONY, J.M.; FRANK, G.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; REED, S.; CAMPOS-NETO, A. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, 36: 827-838, 2005.
83. PALATNIK, C.B.; MORENO, M.B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the fucose mannose ligant (FML). *Braz. J. Med. Res.*, 27: 547-551, 1994.
84. SILVA, V.O. da.; BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N.N.C.; SOUSA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M. & PALATNIK, C. B. S. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine.*, 19: 1068-1081, 2001.

85. PALATNIK, C.B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA PREVIATO, L.. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophage by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect. Immun.*, 57: 754-763, 1989.
86. PALATNIK, C.B.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate gp63 is the major immunogen of the fucose mannose ligand (FML). *Acta trop.*, 53:59-72, 1993.
87. COX, J.C; COUTER, A.L. Classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 15: 248-256, 1997.
88. BORJA-CABRERA, G.P.; CORREA PONTES, N.N.; DA, S.; PARAGUAI DE S. E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.; PALATNICK, M.; PALATNICK-DE-SOUZA, C.B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil A saponin vaccine in na endemic área of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-3284, 2002.
89. BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. Long lasting protection agaisnt canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20: 3277-328, 2001.
90. BORJA-CABRERA, G.P.; CRUZ MENDES, A; PARAGUAI DE SOUZA, E; HASHIMOTO OKADA, L.Y.; DE A TRIVELLATO, F.A.; KAWASAKI, J.K.; COSTA, A.C.; REIS, A.B.; GENARO, O.; BATISTA, L.M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. Jun 2;22(17-18):2234-43, 2004.
91. MENDES, C.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P.; MELLO BATITA, M.L.; SANTOS, M.A.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 21/19-20: 2589-2597, 2003.
92. COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI. G.; GAZZINELLI, R. T. & FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) Donovanii* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania)amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 71: 3988-3994. 2003.
93. GURUNATHAN, S.; SACKS, D.L.; BROWN, D.R.; REINER, S.L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R.A. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers proctetive immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 186: 1137-1147. 1997.
94. GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.* 4: 26. 2005.

95. MELBY, P.C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L.E. & CHENG, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69: 4719-4725. 2001.
96. WELBURN, S.C.; MURPHY, N.B. Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell Death Differ.* 5: 615-622. 1998.
97. DONDJI, B.; PERZ-JIMENEZ, E.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; ESTEBAN, M.& MAHON-PRATT, D. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73: 5286-5289, 2005.
98. RAFATI S.; COUTY-JOUVES, S.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; LOIS, J.A. Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp.Immunol.* 110:203-211, 1997.
99. BRUSIC, V.; AUGUST, J.T.; PETROVSKY, N. Information technologies for vaccine research. *Expert. Rev. Vaccines.* 4: 407-417. 2005.
100. RAVINDRAN, R.; ALI, N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr.Mol.Med.* 4: 697-709, 2004.
101. KHAMESIPOUR, A.; RAFATI, S.; DAVOUDI, N.; MABOUDI, F.; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J. Med. Res.* 123: 423-438. 2006.
102. COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies the define canine homologues of human CD antigens: Sumary of the Frist International Canine Leusckocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, 43: 137-154, 1994.
103. CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; KAPLANSKI, C. Sceening of 78 monoclonal antibodies directed against human leucocyte antigens for cross-reactivity with surface markes on canine lymphocytes. *Tissue Antigens*, 43: 202-205, 1994.
104. SCHUBERTH, H.J.; RABE, H.U.; BEER, A.; LEIBOLD, W. crossreactivity of workshop monoclonal antibodies with canine blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 60: 419-424, 1998
105. CULMSSE, K.; SIMON, D.; MISCHKE, R.; NOLTE, I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J. Vet. Med.*, 47: 199-206, 2001.
106. WEISS, D.J. Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulation of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 62: 1229-1233, 2001.
107. KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; KURTZHALS, J.A.L.; THEANDER, T.G. Leishmania-specific T cells expressing interfern-gamma (IFN-g) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clin Exp. Immunol.*, 116: 500-504, 1999.

108. FORMAN, J. T cells, the MHC, and function. *Immunol. Rev.*, 81: 203-219, 1984.
109. PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G. & RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infec Imm*, 62(1): 229-235, 1994.
111. HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J.L.; Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with Leishmania infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol Immunopathol.*, 15;106(3-4):247-57, 2005.
110. ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.; ET AL. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (*Leishmania*) chagasi. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 349-358. 2009.
112. LEMESRE, J. L.; HOLZMULLER, P.; GONCALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G.; HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, v.25, n.21: 4223-34. 2007.
113. RODRIGUES, C. A.; BATISTA, L. F.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O.; DE SÁ OLIVEIRA, G.G.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. *Vet Parasitol.* v.143, n.3, p.197-205, 2007.
114. RODRIGUES, C. A.; BATISTA, L. F.; FILHO, R. S.; SANTOS, C. DA S.; PINHEIRO, C. G.; ALMEIDA, T. F.; FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. *Vet Immunol Immunopathol.* v.127,n.3, p.382-388, 2009.
115. BALKWILL, F.R.; BURKE, F. The cytokine network. *Immunol today*, 10(9): 299-304, 1989.
116. PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; GEBHARD, D. del REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur.J. Immunol.*, 25: 1594-1600, 1995.

117. PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D.D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 24(3):187-95, 2001.
118. FACCHETTI, F.; VERMIN, W.; FIORENTINI, S.; CHILOSI, M.; CARUSO, A.; DUSE, M.; NOTORANGELO, L.D.; BADOLATO, R. Expression of inducible oxide nitric synthase in human granulomas and histiocytic reaction. *Am. J. Pathol.*, 154: 145-152, 1999.
119. DE VERA, M.E.; SHAPIRO, R.A.; NUSSLER, A.K.; MUDGETT, J.S.; SIMMONS, R.L. MORRIS, S.M.; BILLIARD, T.R.; GELLER, D.A. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1054-1059, 1996.
120. TAUB, D.D.; COX, G.M. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J. Leuko Biol.* 58: 80-89, 1995.
121. OSWALD, I.P.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SCHWARTZ, B.; CASPAR, P.; PAULIN, D. SHER, A. & JAMES, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill intravascular parasite, *shistosoma mansoni*, through production of oxide nitric. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 999-1003, 1994.
122. VOULDOUKIS, I.; BECHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; DA SILVA, O.; DEBRE, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and Interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infatum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.*, 27:860-865, 1997.
123. BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parasitologia*, 43 suppl 1:1-6, 2001.
124. GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, 167:893-901, 2001.