UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO (UFOP)
ESCOLA DE FARMÁCIA (EFAR)
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS (DEACL)

Monografia

AVALIAÇÃO DO XENODIAGNÓSTICO E DA CARGA PARASITÁRIA NA PELE DE CÃES DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM *L. Infantum* APÓS A VACINAÇÃO COM OS IMUNOBIOLÓGICOS LBSAP, KMP-11, LEISHMUNE® E LEISH-TEC®.

MARIANA YUMI DOMOTO NAGAOKA

OURO PRETO
2021

MARIANA YUMI DOMOTO NAGAOKA

AVALIAÇÃO DO XENODIAGNÓSTICO E DA CARGA PARASITÁRIA NA PELE DE CÃES DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM *L. infantum* APÓS A VACINAÇÃO COM OS IMUNOBIOLÓGICOS LBSAP, KMP-11, LEISHMUNE® E LEISH-TEC®.

Trabalho apresentado como parte das exigências para conclusão do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de farmacêutico. O trabalho conta com a orientação do professor Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares e com a coorientação do professor Dr. Alexandre Barbosa Reis.

OURO PRETO
2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

N147a Nagaoka, Mariana Yumi Domoto .
Avaliação do xenodiagnóstico e da carga parasitária na pele de cães desafiados experimentalmente com L. Infantum após a vacinação com os imunobiológicos LBSAP KMP-11 LEISHMUNE® e LEISH-TEC®.. [manuscrito] / Mariana Yumi Domoto Nagaoka. - 2021.
54 f.: il.: , gráf., tab.. + Anexo.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares .
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose visceral. 2. Vacinas. 3. Xenodiagnóstico. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Soares , Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANALISES CLINICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Yumi Domoto Nagaoka

Avaliação do xenodiagnóstico e da carga parasitária na pele de cães desafiados experimentalmente com *L. infantum* após a vacinação com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec®

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 27 de agosto de 2021

Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Guilherme de Paula Costa - Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 30/08/2021

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2021, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0215507** e o código CRC **A0A99944**.

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

RESUMO

A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma zoonose de grande impacto na saúde pública, pois tem como reservatório o cão. Sendo assim, é uma doença altamente prevalente e em áreas endêmicas podem afetar até 80% dos cães. Até o momento não há esquemas terapêuticos eficazes para a cura parasitológica, autores sugerem aplicações de vacina anti-LVC, como uma importante medida de controle da doença. Esse estudo avaliou o possível bloqueio da transmissão a flebotoíneos através do xenodiagnótico e da carga parasitária na pele de cães desafiados experimentalmente com *L. infantum* após vacinação com imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® em um ensaio clínico vacinal de Fase I e II. Após a infecção com *L. infantum* pela via endovenosa os cães foram acompanhados por um ano, foi realizada a análise detalhada e comparativa da carga parasitária em flebótomos (após o xenodiagnóstico) bem como na pele dos cães. A avaliação parasitológica por qPCR na pele foi capaz de encontrar cães positivos apenas nos grupos KMP-11, Leish-Tec®, Leishmune®. Em relação ao xenodiagnóstico, apenas no grupo controle (não vacinado) encontrarmos flebótomos positivos para a doença, com um percentual de 14,3%, sendo este um indicativo de que as vacinas testadas conseguiram bloquear a transmissão do parasito para o vetor. A única vacina que em ambas os alvos testados, tanto pele quanto nos flebotomíneos, foi negativo na qPCR para o DNA de *Leishmania*, foi o imunobiológico LBSap, apresentando 100% de proteção, podendo ser considerada um bom candidato vacinal para o prosseguimento de ensaios clínicos de fase III. Nesse sentido, nesse trabalho avaliaremos a potência/eficácia de diferentes imunobiológicos contra LVC, através da PCR em tempo real para avaliarmos a carga parasitária diretamente na pele de orelha bem como indiretamente através de flebótomos alimentados na pele desses cães.

Palavras chaves: vacinas, leishmaniose visceral canina, LBSap, KMP-11, Leish-Tec®, Leishmune®

Lista de Ilustrações

Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais controle (C); vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem dos Kinetoplastida de 11 kDa, de *Leishmania infantum*). **27**

Figura 1: Avaliação parasitológica na pele de orelha de cães pela técnica de PCR em tempo real. (A) Número de animais positivos na pele. No eixo y estão representados os diferentes grupos: Controle LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11, e no eixo x o percentual de positividade na pele. (B) Carga parasitária da pele. No eixo y está representado o número de amastigotas por miligramas de pele, e no eixo x os diferentes grupos experimentais. **35**

Figura 2: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Controle. A seta azul indica amplificação do DNA do parasito (carga estimada em 83 parasitos por flebótomo fêmea). A seta verde indica a amplificação do controle positivo para *Leishmania infantum* equivalente a 200 parasitos. As demais curvas representam a correta amplificação do gene de referência dos flebótomos..... **38**

Figura 3: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo LBSap®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da figura 2. ..... **39**

Figura 4: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Leishmune®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2. ..... **39**

Figura 5: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Leish-Tec®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2. ..... **39**

Figura 6: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo KMP-11. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2. ..... **39**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição de iniciadores e sondas para qPCR. **..... 29**

Tabela 2: Porcentagem de positividade de infecção por L. infantum pelo xenodiagnóstico para os diferentes grupos experimentais. **..... 40**

Lista de Abreviaturas

ASLi – Antígeno solúvel de *L. infantum*;

$CaCl_2$ – Cloreto de Cálcio;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;

Efar – Escola de Farmácia

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay;

g – Gramas;

GP-36 – Glicoproteína de peso molecular 36

HCL – Ácido clorídrico;

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio;

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico;

ICB - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

IFN-g – Interferon gama;

IL-2 – Interleucina 2;

IL-4 – Interleucina 4;

IL-10 – Interleucina 10;

IL-12 – Interleucina 12;

KCl – Cloreto de potássio;

kg – Quilograma;

LC – Leishmaniose cutânea;

LCD - Leishmaniose cutâneo difusa;

LIMP – Laboratório de Imunopatologia;

LIT – Liver infusion tryptose médium;

LMC – Leishmaniose mucocutânea;

LV – Leishmaniose visceral;

LVH – Leishmaniose visceral humana;

mg – Miligrama;

mL – Mililitro;

MS – Ministério da Saúde;

NaCl – Cloreto de sódio;

NK – *Natural killer*;

NO - Óxido nítrico;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

PBS – *Phosphate buffer saline* (tampão de fosfato salina);

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;

PVCLV - Programa de Vigilância e Controle da LV;

RNA – Ácido ribonucleico;

RNAm – RNA Mensageiro;

rpm – Rotação por minuto;

RT – qPCR – Real Time Quantitative PCR;

SFB – Soro Fetal Bovino;

TH_1 - Células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas;

TH_2 - Células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas;

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto;

WHO – *World Health Organization* (OMS);

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 10
1.1. Referencial teórico 10
1.1.1. Leishmaniose visceral 10
1.1.2. Vacinas contra leishmaniose visceral canina 13
1.1.3. Xenodiagnóstico 18
II. JUSTIFICATIVA 24
III. OBJETIVOS 25
3.1. Objetivo geral 25
3.2. Objetivos específicos 25
IV. METODOLOGIA 26
4.1. Grupos experimentais 26
4.2. Infecção/Desafio Experimental 26
4.3. Delineamento experimental e abordagens investigativas 26
4.4. Xenodiagnóstico 27
4.4.1. Xenodiagnóstico: Transmissibilidade de L. infantum de cães infectados para L. longipalpis 28
4.5. Eutanásia dos cães 30
4.6. Análise Molecular para quantificação da carga parasitária na pele pela técnica de PCR em tempo real 30
4.6.1. Extração do DNA das amostras 30
4.6.2. Construção da curva padrão para a PCR em tempo real 31
4.7. Análise Estatística 32
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
5.1 Avaliação parasitológica pelo método de qPCR: pele e xenodiagnóstico 34
VI. CONCLUSÕES 43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44
ANEXOS 54

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada que tem como seu causador o protozoário do gênero *Leishmania spp.,* é uma doença infecciosa que apresenta uma ampla distribuição global, sendo os países em desenvolvimento os mais afetados, o Brasil é um dos países que apresentam uma alta prevalência para essa doença (Alvar, *et al*, 2004). A leishmaniose apresenta distintas formas, sendo as mais comuns, a leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral, esta última atinge os humanos, mamíferos (Desjeux, 2004; Chappuis et al., 2007; Ameen, 2010; WHO, 2010). Esta, por fim, tem o cão como o principal reservatório da doença. O principal vetor dessa zoonose é o flebotomíneo fêmea, que através de seu repasto sanguíneo transmite o parasito de *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1987). A crescente prevalência, da leishmaniose visceral tem como base a urbanização e o crescente contato do ser humano com o cão infectado (Alvar, Canavate, C.; Molina, R, 2004). Na tentativa de conter essa alta prevalência, órgãos de saúde propõem como medida profilática o uso de inseticidas, redes de proteção, tratamento de pessoas doentes e a eutanásia de cães soropositivos (OMS, 2012). Até o momento, não há esquemas terapêuticos ou cura parasitológica para leishmaniose canina visceral (LVC), então, a principal alternativa para o controle da doença seria vacinas anti-LVC, que controlaria a infecção canina e consequentemente a infecção em humanos (OMS, 2012; EMS, 2014.). Assim, é de grande importância o desenvolvimento de novas vacinas contra a LVC bem como de metodologias que possam ser empregados na avaliação da inocuidade, imunogenicidade e potência de candidatos vacinais em ensaios clínicos de fase I e II. Nesse sentido, este trabalho de conclusão de curso visou avaliar ferramentas para avaliação da potência vacinal de protótipos vacinais contra LVC (a vacina LBSap e a vacina KMP-11), em um ensaio vacinal de fase I e II comparativo com vacinas comerciais (Leish-Tec®, Leishmune®).

1.1. Referencial teórico

1.1.1. Leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças infecciosas causada por espécies distintas do gênero *Leishmania* spp. e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é considerada uma doença que apresenta grande impacto na saúde pública no Brasil e no mundo. Logo, um potencial reservatório doméstico, comportando-se como um importante elo no ciclo de

transmissão da LV. A leishmaniose contém cinco formas distintas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo mucosa (LCM), leishmaniose cutâneo difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV) (Desjeux, 2004; Chappuis et al., 2007; Ameen, 2010; WHO, 2010), sendo, a LV mais grave e fatal quando não tratada (Desjeux, 2004, WHO, 2010).

A transmissão é feita por hospedeiros invertebrados, fêmeas de insetos pertencentes à família *Psychodidae* (Subfamília: Phlebotominae) (Lainson & Shaw, 1987). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal transmissora da *L. infantum* no Brasil, no qual causa a LV humana (Sacks & Kamhawi, 2001; Lainson & Rangel, 2005).

A infecção da LV, tem início pela picada do flebotomíneo infectado pelo parasito, após a inoculação desses parasitos no corpo do cão, eles são rapidamente distribuídos para o linfonodo e baço, por meio da via sanguínea e/ou linfática. A partir desses órgãos os parasitas espalham para o rim e o fígado. E posteriormente, vão para os órgãos reprodutores, pele, bexiga, sistema digestivo, respiratório, medula e ossos. Entretanto, nos humanos o local de infecção é um pouco limitado, o parasito tem tropismo apenas em órgãos como baço, fígado e medula óssea (Alvar, Canavate, C.; Molina, R, 2004).

A sintomatologia da LVC varia de cães assintomáticos até quadros clínicos mais graves. Os cães assintomáticos são aqueles que não apresentam sinais clínicos visíveis, são considerados animais aparentemente saudáveis, os cães oligossintomáticos apresentam alguns sinais clínicos da doença como, ulcerações cutâneas na ponta das orelhas e em áreas periorbitais, também podem apresentar perda de peso e alopecia. Por fim, temos os cães sintomáticos que exibem os sinais típicos da doença como ulcerações cutâneas por todo o corpo, cegueira, anorexia progredindo para o estado de mortalidade. A imunidade, quantidade de parasitos interferem nos sintomas e no desenvolvimento da doença no cão, podendo assim variar de individuo para indivíduo (Mancianti, et al., 1988; Alvar, *et.al*, 2004; Reis, et al, 2009).

Faz se necessário conhecimento sobre a patogenia da doença canina, assim como seus sintomas clínicos, já que o cão é considerado um dos principais hospedeiros do parasito. Do ponto de vista epidemiológico a LVC pode ser considerada mais importante que a leishmaniose visceral humana (LVH), devido a sua alta prevalência e elevado parasitismo

cutâneo (Desjeux, 2004), em consequência da forma amastigota presente na pele desses animais, tornando-se uma fonte de infecção para *L. longipalpis* (Lopes, 2020).

A OMS, no ano de 2015, classificou a leishmaniose como uma doença tropical negligenciada, pois essa enfermidade apresenta indicadores ineficazes, investimentos de pesquisa reduzido, assim como a produção de medicamento e um controle ineficiente. Ocasionando assim, altas taxas de mortalidade e consequentemente a propagação endêmica dessa enfermidade em regiões pobres ao redor do mundo (OMS, 2015).

A leishmaniose visceral é uma doença que acomete, principalmente, regiões tropicais, quando não tratada pode gerar uma alta letalidade no ser humano. Sendo assim, é considerada uma das seis doenças endêmicas prioritárias no mundo (Costa, 2018). África Oriental, América do Sul, Região do Mediterrâneo e Sul da Ásia são consideradas uma das regiões mais afetadas pela LV, com um número de novos casos por ano de aproximadamente 50.000 a 90.000. Verifica-se que cerca de noventa por cento desses novos casos ocorre no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Alvar, 2006).

A expansão de LV em países Latinos está relacionado ao desmatamento e modificação dos ambientes naturais; urbanização associado à migração de pessoas da área rural, assim como seus cães domésticos infectados, pobreza e falta de saneamento básico. Esses fatores estão correlacionados com o aumento de casos de LVH (Marcondes, 2019).

No Brasil, a incidência anual de LV chega a 3.481 casos notificados (Alvar et al., 2012), contabilizando cerca de 95% dos casos registrados no continente americano (Desjeux, 2004). A LV é considerada uma doença tipicamente rural, e de acordo com o Ministério da Saúde, a região Nordeste apresentava cerca de 90% dos casos notificados, porém desde a década de 1980, o calazar vem se distribuindo para outras regiões do país, sendo a região Sudeste uma das mais afetadas (Costa, 2018). Apesar dos princípios fundamentais da epidemiologia da LV, bem como as medidas de controle serem bem conhecidos, tem se observado uma crescente urbanização da doença (Alvar et al., 2012).

Segundo o Manual de Vigilância e Controle da LV (2014), destaca como principais medidas preventivas, as medidas de proteção individual como o uso de telagem, mosquiteiros e repelentes. Outra medida está relacionada ao vetor utilizando métodos

sanitários como inseticidas, em áreas de maior transmissibilidade. Por fim, as medidas dirigidas as populações caninas, através do diagnóstico e recomendação de eutanásia dos animais positivos.

Nos últimos anos foi possível notar que a infecção por *Leishmania infantum* em cães sugerem que o controle da LVH é altamente dependente de um controle efetivo da LVC (Alvar et al., 2004). Estudos epidemiológicos apontam que em locais com a ocorrência de transmissão ativa de LV, animais domésticos como cães, podem ser considerados marcadores que antecipam casos de LV em humanos (Lopes, 2020).

A forma grave da doença pode se desenvolver em cães suscetíveis, culminando na morte desses animais. O tratamento quimioterápico disponível no mercado brasileiro é limitado, pois animais assintomáticos ainda podem transmitir a doença (Regina-Silva, 2016). Logo, o tratamento não é recomendado, no Brasil, como medida de controle em massa dessas populações. Além disso, por também não possuirmos uma vacina contra LVC recomendada e utilizada pelo MS em campanhas de vacinação contra a LVC, a eutanásia de cães soropositivos continua sendo recomendada e considerada pelo MS como uma importante medida de controle da LV. (Regina-Silva, 2016; MS, 2009; Costa et al., 2018).

Entretanto, em função da relação próxima entre o homem-cão na sociedade atual, a eutanásia de cães soropositivos para *Leishmania*, torna-se cada vez mais questionável (Palatnik-de-Sousa et al., 2001). Nos últimos anos, milhões de cães foram rastreados por técnicas sorológicas e milhares de cães soropositivos foram eliminados, mas a incidência de LVH não foi reduzida a um nível aceitável (Braga et al., 1998; Costa et al., 2011).

O desenvolvimento de vacina anti-LVC pode ser considerada uma boa alternativa para combater a expansão da doença (Gradoni, 2001; Reis et al., 2010), pois a quimioterapia na LVC ainda não alcança a cura parasitológica (Noli & Auxilia, 2005). Desta maneira, a vacina seria uma melhor opção para o controle da doença.

1.1.2. Vacinas contra leishmaniose visceral canina

O desenvolvimento de uma vacina protetora contra a LVC é uma alternativa que permite a interrupção do ciclo de vida do parasito, como também sua transmissão (Tesh, 1995; Dye, 1996) para cães e, consequentemente, para os humanos. Portanto, é necessário investimento e o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra leishmaniose tanto para

cães quanto para humanos. É importante frisar que essas vacinas sejam seguras, pois em tratamentos anteriores foi possível observar toxicidade frente aos medicamentos usados, o aumento do risco de doenças em indivíduos imunocomprometidos, entre outros (Tesh, 1995).

Uma vacina eficaz deve induzir uma resposta imune pró-inflamatória forte e duradoura (expressando citocinas Th1) em células caninas. No caso da leishmaniose, uma vacina eficaz é aquela que induz uma resposta imune do tipo Th1 que diminuirá a multiplicação e disseminação do parasita. Sabe-se que células B e monócitos circulantes em baixa concentração predizem uma LVC mais grave. Entretanto, um aumento de linfócitos TCD8+ circulantes pode caracterizar uma infecção assintomática para doença (Reis, et al., 2009; Gradoni, *et al*., 2015).

As vacinas anti-LV são baseadas em estudos de Fase I e II, nos quais utilizam na maioria das vezes camundongos ou cães como modelos experimentais. (Reis et al., 2010). De acordo com as recomendações da OMS, estudos vacinais de Fase I comparam indivíduos imunizados com indivíduos tratados com placebo, e avaliam a imunogenicidade e segurança da vacina. Já estudos de Fase II verificam a proteção vacinal a partir de um desafio experimental, indicam também uma estimativa da eficácia nestas condições experimentais, este teste é questionável pelo valor do desafio experimental.

Ensaios de Fase III analisam a eficácia da vacina contra a infecção nas áreas endêmicas, ou seja, na área onde a doença ocorre, em suas condições naturais. Todos esses ensaios devem ser realizados como estudo duplo-cego randomizado com dezenas de milhares de indivíduos, essa quantidade de indivíduos é calculada por epidemiologistas com base na incidência da doença na área endêmica. Se a vacina passar em todas essas etapas, a formulação pode ser transmitida ao registro e industrializada. Ensaios vacinais de Fase IV são feitos após a industrialização, no qual acomete quantidades maiores de indivíduos (cerca de 10.000-100.000 indivíduos), como parte de uma campanha nacional de imunização. Até o momento não são feitos estudos de Fase IV o Brasil. Por motivos éticos, nos ensaios de Fase IV controles tratados com placebo não entram nos dados vacinais e a eficácia da vacina é medida antes e depois do tratamento (OMS, 2010).

Devido ao grande número de casos de LVH e LVC descritos no mundo nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa tem contribuído com o desenvolvimento de potenciais imunoprofiláticos anti-LVC (Reis et al., 2010; Moreno, 2019). Desde de 2004, no mundo, foram licenciadas 4 vacinas contra a LVC, sendo duas no Brasil (Leishmune®, cuja sua licença de produção e comercialização foi retirada no ano de 2015 e Leish-Tec®) e duas na Europa (CaniLeish® e LetiFend®) (Velez, 2020).

Leishmune® foi a primeira vacina a ser licenciada, e foi desenvolvida a partir de antígenos purificados do complexo Donovani (Fucose Manose Ligand) contra LVC (Leishmune®, Fort Dodge Saúde Animal Ltda), é considerada uma vacina de segunda geração, e foi utilizada em clínicas veterinárias sob autorização do Ministério da Agricultura e Abastecimento (Borja-Cabrera et al., 2002) até o ano de 2015. Estudos realizados por Palatnik-de-Souza, no ano de 1993, foi capaz de designar a fração antigênica da vacina fucose manose ligante, que consiste na glicoproteína "GP36", essa porção antigênica está presente na superfície da *L. donovani*, importante na interação entre o parasita e o hospedeiro. Posteriormente, foram realizados estudos vacinais em modelos murinos, em grupos que apresentavam adjuvantes como saponina, adjuvante incompleto de Freud e hidróxido de alumínio, sendo possível observar que presença destes demonstraram um aumento na quantidade de anticorpos e na redução da carga parasitária hepática (Santos WR, 1999; Palatnik-de-Souza, 1995). Ensaios vacinais de Fase III demonstraram 92% a 95% de proteção contra a LVC no grupo vacinado correspondendo a 76% de eficácia vacinal (Da Silva et al., 2001, Borja-Cabrera et al., 2002). A vacina foi retirada do mercado brasileiro em 2015, pois faltava evidências nos ensaios de fase III, devido a eficácia da vacina, de acordo com o Ministério de Agricultura do Brasil. (MAPA, 2014).

A única vacina que se encontra disponível no mercado brasileiro para imunização contra LVC é a vacina Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal S/A) composta pela proteína recombinante A2 de amastigotas de *L. donovani* associada ao adjuvante saponina (Fernandes et al., 2008). Um estudo realizado por Gosh, *et al*. (2001), foi capaz de demonstrar que a imunização com proteínas recombinantes A2 em camundongos induziram uma proteção contra o parasito e uma produção de anticorpos específicos para A2, e *in vitro* houve um aumento da produção de IFN-gama em esplenócitos. Foi realizado um estudo com cães da raça beagle, no qual detectaram altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2,

aumento significativo na produção de IFN-γ in vitro, com 4/7 animais do grupo vacinado apresentando a presença do parasito em medula óssea (Fernandes et al., 2008). Um ensaio randomizado foi executado em uma área endêmica, notificou que os animais avaliados demonstraram uma redução 46,6% no método xenodiagnóstico e a eficácia de cerca de 80,8%, ambos no grupo vacinal (|Regina-Silva, 2016). Toepp e colaboradores (2018), realizaram um ensaio duplo-cego randomizado, usando placebo, e obtiveram como resultado uma diminuição progressiva dos sinais clínicos da doença e redução da mortalidade. Apesar dos importantes resultados obtidos pela avaliação da Leishmune® e da vacina Leish-Tec®, o MS não preconiza o uso destas vacinas como medida de controle e profilaxia da LV no Brasil, juntamente ao programa de vigilância e controle da LV (PVCLV) para fins de saúde pública (MS/Brasil, 2005, 2007, 2009).

Vários estudos, de diferentes grupos de pesquisa, têm avaliado a imunogenicidade e capacidade de proteção de um antígeno recombinante denominado KMP-11 (proteína 11 de membrana do Kinetoplasto), através de uma vacina recombinante ou até mesmo do desenvolvimento de vacinas de DNA. Estes autores, demonstraram que estes cães desenvolvem uma resposta imune Th1, sugestiva de proteção, devido ao aumento do nível de expressão de mRNA de citocinas como IFN-γinduzida por CMSP após estímulo com r-KMP-11 em contrapartida a baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 produzidas em resposta ao r-KMP-11(Carrilo et al., 2008). Mortazavidehkordi e colaboradores (2018), produziram uma vacina lentiviral que expressam em sua superfície proteínas fusionadas KMP11-HASPB, esse imunobiológico intensificou a resposta imune de camundongos desafiados com o *L. major*, devido ao aumento de IgG_1, IFN-γ e IgG_{2a}, enfatizando que essas duas últimas citocinas quando ativadas induzem a ativação Th1 e macrófagos. Entretanto, nenhum trabalho ainda foi publicado para averiguar a segurança e imunogenicidade desta formulação vacinal em cães.

Cani-Leish® e a Leti Fend®, são duas outras vacinas disponíveis comercialmente no mercado Europeu. A primeira, vacina LiESP / QA-21, autorizada na União Européia como Cani-Leish® (Virbac, França), composta por proteínas excretadas secretadas (ESP) purificadas com *L. infantum* (LiESP). Essas proteínas são produzidas por meio de um sistema de cultura livre de soro registrado pelo Institut de Recherche pour le Développement (IRD), em sua composição temos também o adjuvante QA-21, uma fração

altamente purificada da saponina *Quillaria saponária* (Moreno, 2012; Oliva, 2014). Estudos realizados por Moreno (2012, 2014), apontam que a vacina LiESP / QA-21 apresentaou resultados promissores, visto que macrófagos reduziram a carga parasitária intracelular em linfócitos autólogos em co-cultura, e a vacina foi capaz de induzir uma reatividade específica à antígenos de *Leishmania*, resultando em um aumento de linfócitos T produtores de IFN-gama. Esses dois resultados foram correlacionados com a indução da via do óxido nítrico, um ótimo mecanismo leishmanicida, apontando ser um bom candidato vacinal, por induzir uma resposta mediada por células Th1 forte e efetiva.

Em um ensaio clínico duplo-cego randomizado e controlado avaliaram a eficácia vacinal da LiESP / QA-21, em cães naturalmente infectados por *L. infantum* em um período de dois meses em uma área endêmica no Mediterrâneo. Obtiveram assim, uma eficácia vacinal e 68,4% e uma proteção de 92,7%, concluindo que a Cani-Leish® é um bom candidato vacinal para controle abrangente da doença em áreas endêmicas (Oliva, 2014).

A segunda vacina licenciada na Europa é a Leti Fend®, constituída pela proteína recombinante Q, que contém em sua formação cinco fragmentos antigênicos de quatro proteínas de *Leismania infantum* (proteínas ribossomais LiP2a, LiP2b e LiP0 e a histona H2A) (Cotrina, 2018; Velez, 2020). Carcelén (2009), conduziu um estudo duplo-cego randomizado utilizando placebo como controle, os animais que receberam dose vacinal apresentaram sinais clínicos mais brandos quando comparado com o grupo controle, os parasitos foram eliminados na maioria dos cães apenas 1/7 apresentaram positividade no grupo Q, já no controle 6/7 e no grupo Q+Q, 4/7 apresentaram positividade. Concluindo que o grupo vacinado apresentou uma maior proteção. Outro estudo duplo-cego randomizado e controlado por placebo em área endêmica foi realizado por Cotrina e colaboradores (2018), em que obtiveram resultados de eficácia satisfatórios (72%) e apresentaram no grupo vacinal uma carga parasitária reduzida.

Os antígenos brutos ainda são muito atrativos em função do custo de obtenção, elevada imunogenicidade, devido ao repertório antigênico oferecido e segurança. Vacinas de primeira geração ainda vêm sendo utilizados em diferentes ensaios clínicos contra leishmaniose (Giunchetti et al., 2007; 2008; Aguiar-Soares et al., 2020). Nas duas últimas décadas nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de biomarcadores de resistência/susceptibilidade à infecção por *L. infantum* em cães. Tais biomarcadores vêm

sendo empregados como estratégia para análise da imunogenicidade em cães vacinados contra *L. infantum*. Neste contexto, duas vacinas desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa (LBSap: composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina; e LBSapSal: mesma composição da vacina LBSap acrescida de extrato de glândula salivar de flebotomíneos) revelaram grande potencial imunogênico por induzirem aumento dos níveis de linfócitos T ($CD5^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD21^+$) circulantes. Além de aumento na atividade de linfócitos T $CD8^+$ *Leishmania*-específicos, acompanhado de intensa atividade linfoproliferativa e elevada produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. Pesquisas realizadas por Roatt, et al. (2012), mostram que o candidato vacinal LBSap apresentou imunogenicidade frente infecção experimental por *L. infantum*, com redução da carga parasitária no baço. Em um estudo vacinal em camundongos, de Mendonça e colaboradores (2016) compararam três imunobiológicos a Leish-Tec®, Leishmune® e LBSap, e observaram em todos os grupos vacinais resultados animadores com diminuição no parasitismo no baço e fígado, e um aumento nos níveis de células da resposta inata. O grupo Leish-Tec® exibiu uma alta quantidade de monócitos $CD14^+$ após desafio. Já o grupo Leishmune® produziu altos níveis de IL-2. A vacina LBSap foi a única que apresentou uma resposta proeminentemente Th1, apresentaram altos níveis de IL-2, IL-6, TNF-a e IFN-g (de Mendonça, *et al.*, 2016).

1.1.3. Xenodiagnóstico

A palavra xenodiagnóstico deriva da língua grega, *xenos* (estrangeiro) e *dignostici* (diagnóstico), é um método indireto de diagnóstico desenvolvido por Brumbt no começo do século XX, esse procedimento utiliza um vetor como meio de cultura biológico, avaliando se o hospedeiro infectado é capaz de transmitir a patogenia para determinado vetor (Schenone, 1999). Este método diagnóstico foi utilizado pela primeira vez na doença de Chagas, na detecção de *Trypasonoma cruzi*. Neste estudo cultivaram em laboratório ninfas de triatomíneos (vetor), que por sua vez se alimentavam do sangue de galinhas, consideradas resistentes ao parasita (Schenone, 1999; Mourya, 2007; Guarga et al., 2000a). Essa ferramenta foi se aperfeiçoando de acordo com o tempo, e estudos mostram que quando combinada com a técnica de PCR real-time (qPCR) a sensibilidade é aumentada (Mourya, 2007; Bravo, 2012; Singh, 2020).

Para uma melhor compreensão de algumas doenças é de suma importância conhecer e identificar a distribuição geográfica de seus vetores, no caso da leishmaniose, o flebotomíneo é o seu principal vetor. Sabe-se que alguns fatores como clima e a ecologia pode interferir na distribuição desses insetos (Gebre-Michael, *et al*,2004; Lara-Silva, *et al*, 2015; Galvis-Ovallos, *et all*., 2017).

A espécie de flebotomíneo responsável pela transmissão da LV no novo mundo é a *Lutzomyia longipalpis* (Genaro,O., 2002; França-Silva et al., 2005). Os flebotomíneos, são dípteros, insetos que apresentam metamorfose completa, passando pelo estágio de ovo, larva, pupa e adulto. Na fase adulta, o flebotomíneo apresenta um tamanho médio de 2 a 4 mm, apresenta um corpo densamente piloso, de coloração amarelada ou castanha e um vôo saltado, e em repouso suas asas ficam eretas (Aguiar & Medeiros, 2003). Seu metamorfismo ocorre em locais ricos em matéria orgânica e ambientes úmidos (Azevedo, et al., 2011).

Flebotomíneos são insetos oportunistas, já que apresentam hábitos alimentares ecléticos e possuem facilidade na adaptação para o ambiente urbano. Logo, as modificações no meio também podem afetar a dinâmica populacional desses vetores (Saraiva et al., 2015; Santos Silva et al., 2017). Consequentemente, a análise dessas variáveis fornece informações acerca da dinâmica de risco de cada área com relação ao vetor, retratando capacidade dos organismos de alterar a sua fisiologia/morfologia de acordo com as condições do ambiente, ou seja, sua plasticidade biológica que cada espécie de flebótomo apresenta diante dos diversos ambientes (Salomón et al. 2015). De acordo com Galati, et al. (2003) e Ready, et al. (2013), até o ano de 2013, o Brasil registrou mais de 229 espécies de flebotomíneos, ou seja, 25,44% do total de espécies registradas em todo o mundo.

Informações a respeito da vulnerabilidade de uma região endêmica para leishmaniose apresenta uma reemergência facilitada quando não investigada. Para uma melhor compreensão dos riscos que a leishmaniose pode causar para a população humana, é necessário compreender os elos que compõe o ciclo de transmissão assim como o entendimento de sua expansão. Deste modo, estudos epidemiológicos são cruciais para o entendimento acerca dos vetores em áreas urbanizadas, compõem um pré-requisito para desenvolver ações preventivas e estratégias contenção dessa zoonose (Coura-Vital et al., 2013).

Um fator muito alarmante que acarreta em diversas modificações ambientais é o intenso processo de urbanização, atuando diretamente no habitat e no comportamento do flebótomo. Esta espécie apresenta um grande poder de adaptação sendo capazes de ocupar novos ambientes, levando assim uma maior proximidade com o meio urbano (Almeida et al., 2010). A *Lutzomyia longipalpis* é uma espécie que tem facilidade em se adaptar a ambientes distintos, incluindo o meio urbano. Sendo considerada uma espécie de flebótomo com um alto grau de sinantropia e com ampla distribuição no território brasileiro (Lainson & Rangel, 2005; Souza et al., 2004; Carvalho et al., 2008).

A capacidade de um determinado do cão infectado de transmitir a doença para o vetor é chamada de infecciosidade. Para avaliar essa infecção é utilizado a técnica de xenodiagnóstico, no qual, utiliza flebotomíneos não infectados criados em laboratório. Foram realizados diversos estudos na Europa e América do sul, em cães sintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, mostrando que a maioria dos cães infectados são infecciosos para a doença, consequentemente, infectam os flebotomíneos que deles se alimentam. Como o decorrer do estudo, foi capaz de se concluir que o aumento da gravidade clínica estava diretamente relacionado com a proporção de cães infecciosos (Quinnel, *et al*.,2009).

A técnica de xenodiagnóstico também é utilizada em casos de leishmaniose canina, pois sabe-se que um mero resultado positivo em testes sorológicos, para avaliar a infecciosidade em cães, não é o suficiente para determinar se aquele animal é capaz de transmitir o parasito para o vetor. A baixa eficiência nas medidas de controle da doença está associada a falta de métodos sensíveis o suficiente para diferenciar cães soropositivos, de cães que realmente transmitem o patógeno (Courtenay, *et al*., 2002). Devido a esse fato, é necessário uma maior intervenção e compreensão nas circunstâncias em que os parasitos são transmitidos do cão para o vetor, assim como nas medidas de controle de cães que podem propagar a doença, neste quesito é de suma importância que o método seja padronizado e sensível, uma vez que a heterogeneidade que existe nas infecções por *L. infantum*, pode acarretar nos diferentes níveis de infecciosidade dos cães (Courtenay, *et al*., 2014; Travi, 2001). Essa divergência pode estar associada a diferentes cepas do parasita, estado imunológico e a capacidade vetorial das diferentes espécies do vetor. Somado ao

fato de que os métodos diagnósticos utilizados não foram capazes de identificar todos os indivíduos infectante (Travi, *et al*., 2001).

Devido a essa dificuldade de identificar cães infectados, Magalhães-Junior, et al. (2016), conduziu um estudo utilizando 50 cães de área endêmica, esses animais foram divididos em três grupos, cães infectados, cães comprovadamente infectados e cães soropositivos para IgG anti-*Leishmania*. Foram analisados sinais clínicos dos cães e a transmissibilidade do parasito pelo método de xenodiagnóstico. No primeiro grupo, 58% (15/26) dos cães foram capazes de transmitir o parasito para o flebotomíneo, no segundo grupo, 53% (8/15) transmitiu o parasito para o vetor, a confirmado através da microscopia óptica, mostrando que a infecciosidade associou-se à gravidade da doença. Já o terceiro grupo apresentou uma baixa taxa de infecciosidade de 11% (1/9) revelando que o método indireto utilizando ELISA, não é um bom indicador de infecção. Nesse estudo também foi observado que cães com a doença em um grau mais grave foi capaz de transmitir mais parasitos para o vetor, quando comparado com os cães com a doença moderada (Magalhães-Junior, et al, 2016).

Outro estudo foi realizado para comparar o método de xenodiagnóstico direto e indireto. Na primeira técnica determinou-se a infecciosidade dos flebotomíneos em cães parasitados por *L. infantum*, e foram classificados de acordo com os sinais clínicos exibidos e não houve diferença na taxa de infecciosidade dos flebótomos. Concluindo que grupos assintomáticos e oligossintomáticos também podem propagar o parasito. Já o método de xenodiagnóstico indireto manuseia flebótomos que foram alimentados com sangue canino em *ex vivo*. O método indireto não se mostrou útil quando comparado com o método direto na detecção de *L. infantum*, uma vez que, o agravamento da doença não coincidiu com o aumento do número de parasitos presentes no sangue, apontando que o método indireto não é um bom indicador prognóstico da leishmaniose (Guarga, *et al*., 2000).

Um estudo que empregou o xenodiagnóstico como ferramenta para avaliação de vacinas contra LVC, empregou dez beagles em diferentes estágios de infecção por *L. infantum*, no qual, 6/10 animais foram imunizados com a vacina LiESP / QA-21 (CaniLeish®; Virbac) e foram expostos a flebótomos para avaliar sua infecciosidade. Apenas 8/10 cães exibiram infecção ativa para a doença, sendo 2/5 cães vacinados e 2/3 do grupo controle eram infecciosos para o flebótomo, concluindo que os cães que foram

imunizados com a vacina apresentaram uma maior proteção frente a infecciosidade dos flebótomos (Bongiorno, *et al*.,2013).

Em outra pesquisa realizada houve a comparação de dois imunobiológicos, Leishmune® e Leish-Tec®, utilizaram para análise 100 cães ao todo; avaliaram a reatogenicidade, resposta humoral, sinais clínicos, parasitismo, além da infecciosidade parasitária pelo xenodiagnóstico (Fernandes, *et al.*, 2014). Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa entre as duas vacinas, inclusive na capacidade dos animais infectarem flebotomíneos. Entretanto, a Leishmune® induziu níveis mais elevados de IgG, IgG1 e IgG2, já os animais vacinados com a Leish-Tec® exibiu com maior frequência e gravidade reações adversas (Fernandes, *et al.*, 2014).

A pele, principalmente, regiões como orelha, nariz e abdômen apresentam um alto parasitismo, independente dos sinais clínicos para a doença, enfatizando que cães assintomáticos são considerados potenciais reservatórios do parasito (Xavier, *et al*., 2006; de Almeida Ferreira, *et al*, 2012). Testes sorológicos podem identificar a exposição cão frente ao parasito, mas não conseguem predizer a infecção ativa. A utilização de métodos diagnósticos empregando microscopia ou cultura, na detecção de parasitos em baço, linfonodo e fígado, era considerado um padrão de referência. Entretanto, essa técnica quando utilizada em cães e humanos não apresenta tanta sensibilidade, sendo variável. A detecção direta de parasitas na pele, pode ser obtida por procedimento cirúrgico extremamente simples, considerada uma boa ferramenta para diagnóstico e para acompanhamento de sinais clínicos de cães em tratamento. A pele da orelha do cão pode ser considerada um bom preditor de infecção, visto que é um lugar de fácil acessibilidade para o vetor (Xavier, *et al*., 2006).

Um estudo de prevalência da LVC realizado na Espanha, acompanhou cães soropositivos para LVC. Os tecidos estudados foram medula óssea, pele e conjuntiva, e a positividade no teste de qPCR para o parasito de *Leishmania* foi, respectivamente, 17,8; 32 e 51%. Sendo possível observar que o tecido que apresentou maior quantidade de parasitos foi a pele (Sollano-Gallego, *et al*., 2001). Estes estudos demonstram o importante papel da pele como fonte de infecção do parasito de *Leishmania* para os flebotomíneos, e que devido a elevada positividade e intenso parasitismo cutâneo nos cães com LVC, independente da forma clínica, fazem dos cães um reservatório natural da doença nas áreas endêmicas

contribuindo para perpetuação do ciclo de transmissão entre cão, flebotomíneo e homem. Assim, se faz necessário estudos voltados para entendermos melhor os mecanismos de transmissão da LVC, o papel da pele como fonte de infecção e a capacidade de cães infectarem flebotomíneos, seja em cães naturalmente infectados de área endêmica, seja em estudos controlados em cães para o desenvolvimento de novas terapias ou vacinas contra a LVC (Sollano-Gallego, *et al*., 2001).

Devido à falta de consenso de quais seriam as melhores metodologias para ensaios vacinais de Fase I e II na avaliação da imunogenicidade e potência/eficácia de vacinas anti-LVC, faz-se necessário a realização de estudos simultâneos e comparativos empregando as mesmas condições, para melhor direcionarmos os melhores candidatos vacinais para prosseguirem em ensaios clínicos vacinais de fase III.

II. JUSTIFICATIVA

A LV é uma doença que se apresenta em franco processo de expansão em diferentes regiões do Brasil e do mundo. O comportamento emergente e reemergente em áreas rurais, urbanas e periurbanas tem-se atribuído a fatores relacionados principalmente ao cão, reservatório doméstico do parasito e mantenedor da transmissão. Até o momento não existe alternativas terapêuticas capazes de conduzir a cura parasitológica em cães infectados e consequentemente reverter o papel de reservatório no ciclo de transmissão. O PVCLV/MS/Brasil aplica a recomendação de eutanásia de cães infectados como uma das principais ações de controle da LV. Esta medida é altamente contestada e muitas vezes não é seguida pelos proprietários. Desta forma, a LVC se posiciona como um grave problema de saúde pública, tornando-se um desafio a ser solucionado pelas autoridades sanitárias de países endêmicos como o Brasil. Considerando o destaque de cães no contexto epidemiológico da LV a imunoprofilaxia canina surge como melhor alternativa para o controle da doença. Embora o Brasil possua uma vacina comercial disponível para clínicas veterinárias, o Ministério da Saúde, até o momento não emprega nenhuma vacina no PVCLV, justificada pela escassez de estudos de Fase I, II e principalmente de Fase III. Para reverter este cenário é de fundamental importância ampliar o aparelhamento de metodologias voltadas à avaliação de ensaios de Fase I, II e III. Neste sentido a incorporação de novas estratégias metodológicas para investigação da imunogenicidade e potência/eficácia vacinal, é essencial para melhor definir potenciais candidatos a uma vacina contra LVC. Desta forma, o presente estudo pretende avaliar potência/eficácia das vacinas LBSap e KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec®, através de diferentes parâmetros de avaliação em um ensaio clínico vacinal de fase I e II comparativo em cães, após protocolo de imunização e submissão ao desafio/infecção experimental por *L.infantum*. Assim, será possível o encaminhamento de forma dinâmica de potenciais protótipos vacinas (LBSap e KMP-11) para prosseguir com testes de Fase III.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a potência/eficácia vacinal em cães imunizados com os imunobiológicos LBSap, Leishmune®, Leish-Tec® e KMP-11 contra leishmaniose visceral canina, em um ensaio clínico de Fase I e II, frente ao desafio experimental com *L. infantum*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o potencial de transmissão do parasito de *L. infantum* em cães vacinados com diferentes imunobiológicos (Leishmune®, Leish-Tec®, KMP-11 e LBSap) após infecção/desafio experimental com *Leishmania infantum*, através da análise dos seguintes parâmetros:

i) Xenodiagnósticos: avaliação da carga parasitária em flebotomíneos alimentados na orelha de cães;

ii) Avaliações da carga parasitária na pele de orelha dos cães por qPCR.

IV. METODOLOGIA

4.1. Grupos experimentais

Um total de 35 cães sem raça definida foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais compostos por 7 cães/grupo, de ambos os sexos, conforme descrito a seguir:

- Grupo Controle: receberam três aplicações de 1 mL de solução salina estéril a 0,9% por via subcutânea;
- Grupo LBSap: receberam três aplicações subcutâneas de 600 μg do antígeno de *Leishmania braziliensis* por dose associado a 1 mg do adjuvante saponina/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,9%;
- Grupo Leishmune: foram imunizados com a vacina comercial Leishmune®, conforme recomendação do fabricante;
- Grupo LeishTec: foram imunizados com a vacina comercial Leish-Tec®, conforme recomendação do fabricante;
- Grupo KMP-11: receberam três aplicações subcutâneas de 100 μg do antígeno recombinante KMP-11 por dose associado a 1 mg do adjuvante saponina/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,9%;

O protocolo de imunização foi composto por três doses vacinais em intervalos de 21 dias.

Vale ressaltar que esse estudo foi embasado na tese de doutorado do Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, e que no fim dos 12 meses de experimento apenas 29 cães permaneceram com vida.

4.2. Infecção/Desafio Experimental

A infecção experimental foi realizada 60 dias após a terceira dose vacinal pela via endovenosa empregando-se uma concentração de $5x10^7$ promastigotas de *L. infantum*, cepa OP46, cultivadas em meio de cultura NNN/LIT em fase estacionária de crescimento. O inoculo foi aplicado pela via endovenosa na veia radial esquerda dos animais.

4.3. Delineamento experimental e abordagens investigativas

Após completo os respectivos protocolos de imunização e realização do desafio/infecção experimental com *L. infantum*, os cães foram acompanhados por 12 meses em que foram realizadas avaliações clínicas na busca de sinais clínicos sugestivos da

doença. O ensaio clínico vacinal de fase I e II proposto no projeto compreende na avaliação da proteção vacinal após o desafio/infecção experimental através da identificação do DNA do parasito de *L.infantum* na pele de orelha dos cães bem como em flebótomos, após o xenodiagnóstico. Para isso, após o acompanhamento longitudinal de 12 meses após o desafio experimental foi realizado a sedação dos cães para realização do xenodiagnóstico, empregando o ´´*flebocontainer*´´. Na semana seguinte, a eutanásia foi realizada seguida da necropsia dos animais para coleta da pele de orelha. A pele de orelha e os flebotomíneos foram acondicionados no freezer -80 para a futura avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real.

Diagrama 1: Esquema do delineamento experimental

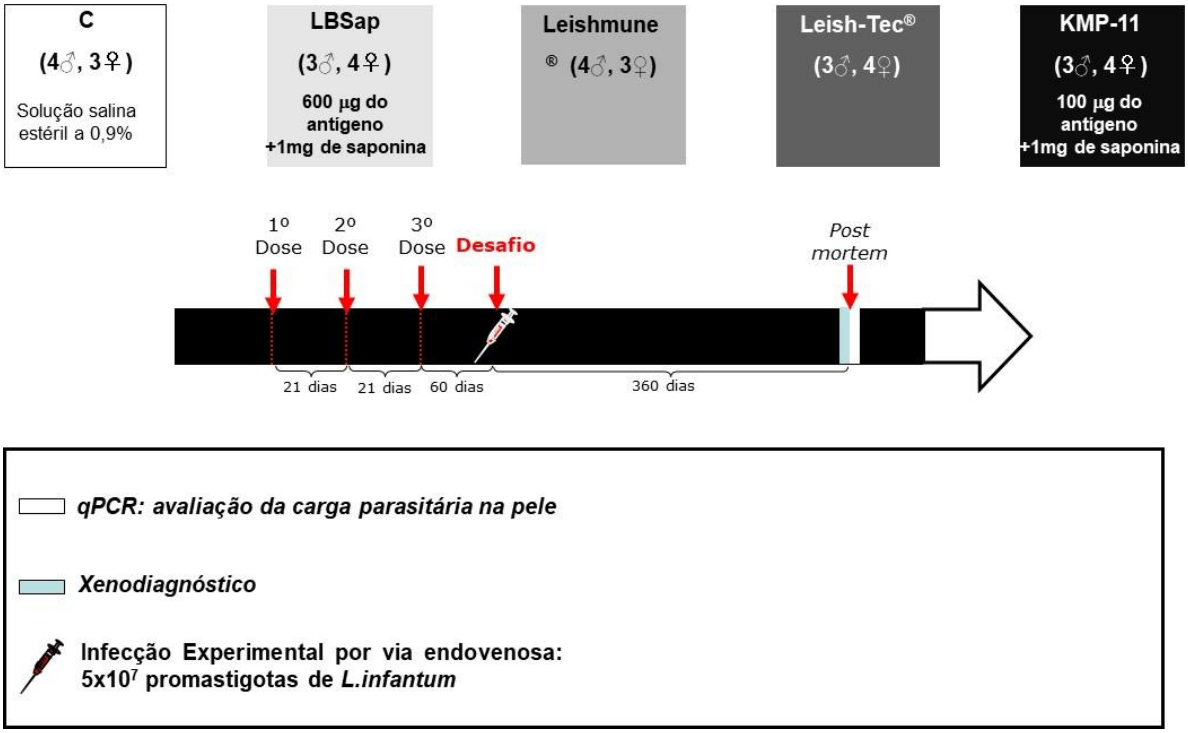

Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais controle (C); vacina de L. braziliensis associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem dos Kinetoplastida de 11 kDa, de Leishmania infantum associado à saponina).

4.4. Xenodiagnóstico

Para realização do xenodiagnóstico foram utilizadas fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes de uma colônia fechada, mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos

Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia do ICB estabelecida a partir de matrizes provenientes da cidade de Teresina, Estado do Piauí (Brasil). Os flebotomíneos empregados neste estudo foram criados em condições de temperatura (25ºC-27ºC) e umidade relativa (60%-70%) semi controladas, segundo a metodologia e condições descritas por Modi & Tesh (1983), com modificações.

Foram utilizadas 35-45 fêmeas e igual número de machos de *L. longipalpis*, com três dias de emergência, alimentados desde a eclosão com solução de sacarose 30% p/v. Estes flebotomíneos foram recolhidos das gaiolas em que são mantidos com um aspirador manual, "capturador de Castro", e foram transferidos para um recipiente apropriado, denominado "Flebocontainer" (da Costa-Val et al., 2007). Após a anestesia dos animais, com o uso de Ketamina e Xilasina, o Flebocontainer foi fixado, de modo que a parte da tela de nylon se mantenha diretamente em contato com pele da porção mediana da face interna da orelha direita dos cães por 30min, em ambiente escuro. Após a realização do repasto sanguíneo nos cães, os flebotomíneos foram imediatamente levados para condições semi controladas em estufa B.O.D. (FANEM® modelo 347), a 25ºC e umidade aproximada de 70%, por cinco dias. Neste período os insetos receberam, como fonte alimentar, solução de sacarose 30% (da Silva et al., 2010). Após os cinco dias, os flebótomos utilizados no xenodiagnóstico foram acondicionados em freezer (-80^{0}C). O xenodiagnóstico foi realizado 12 meses após o desafio experimental endovenoso com 1x10^7 promastigotas de *L.infantum*.

4.4.1. Xenodiagnóstico: Extração de DNA dos flebotomíneos após o xenodiagnóstico.

Os flebótomos utilizados no xenodiagnóstico e que foram acondicionados em *freezer* (-80^{0}C), foram separados em subgrupos de 10 fêmeas por microtubos DNAse e RNAse *free*. As amostras receberam 500 µL de tampão de lise (Tris HCl, EDTA, SDS, NaCl) e o DNA total das amostras foi extraído utilizando NaCl/Brometo de hexadeciltrimetilamônio (Moreira, *et al*., 2012), suspendido em 50µL de água livre de nucleases e dosado por espectrofotometria. Amostras sem insetos e com flebótomos machos foram utilizadas como controles negativos. Para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foi utilizada quantificação absoluta com base em controles positivos de DNA extraído de cultura com 10^6 promastigotas de *Leishmania infantum*, cepa MCAN/BR/2008/0P46. O DNA total foi extraído como já descrito, e diluído no fator 1:10 até 10^0 parasitos/µL para confecção das

curvas padrão. A cada ponto da curva, foram adicionados 20 ng de DNA extraído de 10 flebotomíneos machos.

Os iniciadores utilizados para *L. infantum* amplificam o gene de cópia única da DNA polimerase (acesso pelo *GenBank:* AF009147). Para o inseto vetor (*Lutzomyia longipalpis*), foram utilizados *primers* endereçados para o gene da periodicidade (acesso pelo *GenBank:* AF446142), (Tabela 1). Para emissão da fluorescência foram utilizadas sondas de hidrólise para cada alvo (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição de iniciadores e sondas para qPCR.

Alvo	**Sequência (5'- 3')**
DNA polimerase (*L. infantum)*	Fw: AGC GCC TCA CCA CGA TTG Rv: AGC GGG CAC CGA AGA GA Sonda: **VIC** AGG AAA CCT GTG GAG CC **MGB NFQ**
Periodicidade (*Lu. longipalpis*)	Fw: ATT TCT TTT CCT TAG GAC CAT CGA Rv: CTT CGG AAA ATT GTT GAT TAA CCA Sonda: **VIC** TCC TCA AGT CTT TGC ATC C **MGB NFQ**

Fw: *Primer* direto; **Rv:** *Primer* reverso.

Para cada amostra, foram adicionados 5 µL de TaqMan Master Mix®2X, iniciadores direto e reverso a 1,0 µM (para *L. infantum* ou *Lu. Longipalpis*), respectiva sonda a 0,25 µM, 20 ng de DNA total e água livre de nucleases suficiente para 10 µL. As reações foram feitas em placas de 96 poços no termociclador 7500 (Life Technologies) conforme os passos: 50ºC por 2 min, 95ºC por 10 min, 40 ciclos de 95ºC por 15 s e 60ºC por 1,0 min. A curva padrão foi aplicada em triplicata e as amostras, em duplicata. Controles negativos utilizando água autoclavada milliQ no lugar de DNA foram aplicados em todas as placas. As curvas de eficiência variaram de 90,93% a 96,76%.

Para cálculo da carga final (**CF**), levou-se em conta a carga parasitária (**P**) indicada pelo ciclo de quantificação (Cq). Desta forma, considerando-se que a carga **P** calculada via Cq está em 20 ng de DNA total, a **CF** referente à amostra total foi obtida por regra de três, obtendo-se a equação [CF = (P x C x 50)/20] em que:

C = Concentração de DNA total extraído de 10 flebótomos fêmeas em ng/μL;

50 = constante referente ao volume de 50 μL de volume de suspensão do DNA purificado;

20 = constante referente a 20 ng de DNA total por amostra utilizados na qPCR.

O resultado de **CF** foi dividido pelo número de flebótomos submetidos à extração de DNA, sendo representado como número de parasitos por flebótomo fêmea. Todos os procedimentos foram executados utilizando-se materiais e reagentes DNAse e RNAse *free*. A confecção do *master mix*, manipulação do DNA e amplificação foram realizadas em ambientes separados seguindo um fluxo unidirecional.

4.5. Eutanásia dos cães

Após as avaliações propostas no estudo, os animais foram submetidos ao processo de eutanásia, utilizando associação de 22 mg/kg de Cloridrato de Quetamina e 2,0 mg/kg de Cloridrato de Xilazina por via intramuscular, como protocolo de anestésico prévio, e aplicação, por via endovenosa lenta, de 20mg/kg de tiopental sódico até obtenção do estado de anestesia geral. Imediatamente foi aplicado, por via endovenosa, uma dose letal de solução de cloreto de potássio, para a obtenção de parada cardiorrespiratória (conforme aprovado no comitê de ética animal da UFOP – Anexo 1). Após a confirmação do óbito, os animais foram submetidos a exame necroscópico, com avaliação macroscópica, seguida de retirada de fragmentos da pele da face interna das orelhas para realização da PCR por tempo real.

4.6. Análise Molecular para quantificação da carga parasitária na pele pela técnica de PCR em tempo real

4.6.1. Extração do DNA das amostras

Para extrações de DNA das amostras de pele foi utilizado o *kit* WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA) conforme manual do fabricante com algumas modificações. Em tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) contendo as

amostras de interesse, foram adicionados 500 mL de solução de lise nuclear (SLN) seguida por incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado pela parede do tubo, 20 μL de proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA) seguindo por homogeneização e incubação *overnight* em banho seco a 55ºC. Após esse período, os tubos foram homogeneizados e adicionados 3 ml de RNAse, seguida por outra incubação em banho seco, a 37ºC por 30 minutos. Posteriormente, 200 μL de solução de precipitação proteica foi adicionado aos tubos, que foram então homogeneizados em vortex, incubados em gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16000 x g (Microcentrífuga Eppendorf®, EUA) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL no qual foi adicionaado 600μL de isopropanol (Merck®, Alemanha), com posterior homogeneização dos tubos por inversão (10 vezes) e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* residual 200 μL de etanol 70% (Merck®, Alemanha), procedendo-se a homogeneização por inversão do tubo (10 vezes). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão do DNA remanescente com adição de 100 mL de solução de hidratação. Após hidratação por 24 horas, 2 mL da solução contendo o DNA extraído foi utilizada para estimar a concentração do mesmo e o grau de pureza nas absorbâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e o restante foi estocado em freezer a -20ºC até a sua utilização. Após esse período, 2 mL foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorbâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, USA), então foram descartados. Os noventa microlitros remanescentes foram estocados em a -20ºC até a sua utilização. Somente a amostra de DNA que teve densidade óptica (DO) na razão 260/280 de 1,7-2,0 e uma DO na razão 260/230 maior que 2,0 foram tomadas para os experimentos de PCR em tempo real.

4.6.2. Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp®Optical 96-, cobertas com adesivos ópticos e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). Os controles positivos de cada placa foram

às amostras diluídas de *Leishmania infantum* utilizadas na curva padrão; e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95ºC por 10min, seguida por 40 ciclos de 95ºC por 15segundos e 60ºC por 1minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10ng/µL); iniciadores (5pmol/µL) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10µL por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada threshold (Ct), calculada pelo programa 7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems. A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições previas das massas de promastigotas de *L.infantum* da curva padrão.

O procedimento descrito acima também foi realizado para a amplificação do gene de GAPDH, que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os iniciadores direto: 5' TTCCACGGCACAGTCAAG 3' e reverso: 5' ACTCAGCACCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o **gene de kDNA *Leishmania spp***. Utilizamos os iniciadores direto: 5' CTCCGGGTAGGGGCGTTC 3' e reverso: 5' GCCCTATTTTACACCAACCCC 3', que amplificam um fragmento de 122pb (acesso no GenBank: AF103738).

4.7. Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software GraphPad Prism* 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). De acordo com os resultados obtidos nas avaliações parasitológicas foram avaliadas diferenças dentro de cada grupo e entre os diferentes grupos experimentais. As variáveis parasitológicas avaliadas neste

estudo se apresentarem distribuição normal, verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e foram analisadas pelos testes paramétricos. Assim, foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) com medidas repetitivas seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey para determinar as diferenças específicas de cada grupo. O Teste t não-pareado foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos no mesmo tempo avaliado. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p for $<0,05$.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação parasitológica pelo método de qPCR: pele e xenodiagnóstico

Na LVC, a elevada quantidade de parasitos na pele do cão, mesmo na ausência de sintomatologia clínica (Deane, *et al*, 1956), favorece a infecção do inseto vetor e consequentemente, a transmissão para o homem (Costa, *et al*, 2013). A comprovação da presença de parasitos na pele é um dado clínico-epidemiológico extremamente importante. Esse órgão assume papel relevante na LVC, não somente pelas manifestações clínicas cutâneas presentes, mas também por ser a fonte de contaminação para os flebotomíneos (Deane & Deane, *et al*, 1955; Deane, 1956; Ferrer *et al*., 1988; Prats & Ferrer, 1995). Um fato interessante foi descoberto por Costa, et al. (2013), que a quantidade mínima de parasitas exigidos em um experimento para positivar no xenodiganóstico é de $3.35x10^5$ nos linfonodos e $3,34x10^2$ nas células mononucleares do sangue periférico.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR), tem como princípio quantificar a carga parasitária em diferentes tecidos. Com o passar do tempo essa nova técnica vem sendo utilizada por diversos pesquisadores, tornando-se uma das ferramentas fundamentais na biologia molecular, para diagnosticar/monitorar a evolução da LV, por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade. Sendo assim, a PCR convencional vem sendo substituída gradativamente (Manna, *et al*., 2004). A qPCR, uma técnica prática e vantajosa, no sentido de avaliar a presença e/ou redução da carga parasitária em animais submetidos a estas intervenções em diferentes protocolos experimentais (Reis *et al*., 2009; Rory *et al*., 2020).

A técnica de qPCR foi utilizada em nosso estudo, sendo essencial para avaliar a carga parasitária da pele dos animais, após o protocolo completo de vacinação com os diferentes imunobiológicos seguindo do desafio/infecção experimental, a fim de testarmos a potência e eficácia vacinal. Vale ressaltar que empregamos na qPCR curvas padrões com concentração conhecida do DNA de *L. infantum*, sendo está uma das maneiras mais eficientes de analisar resultados na qPCR (Cikos *et al*., 2007).

O resultado parasitológico da qPCR na pele dos cães conseguiu identificar 5 cães positivos de um total de 29 cães, apresentando um percentual de 17% de positividade total (Figura 1A). Sendo que o grupo Leishmune apresentou um maior percentual de positividade na pele de orelha (33%), seguido do grupo KMP-11 (28%) e grupo Leish-Tec (20%). Os

animais positivados, de maneira geral, apresentaram baixa carga parasitária, com exceção do grupo Leishmune®, que obteve uma carga média de 4310 parasitos/mg de tecido/pele de orelha (Figura 1)

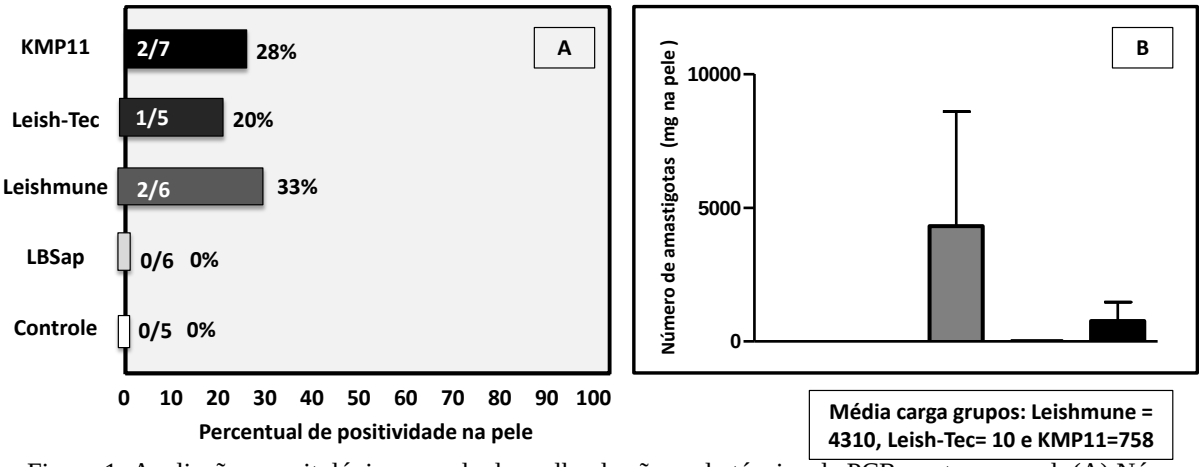

Figura 1: Avaliação parasitológica na pele de orelha de cães pela técnica de PCR em tempo real. (A) Número de animais positivos na pele. No eixo y estão representados os diferentes grupos: Controle ( ), LBSap ( ), Leishmune ( ), Leish-Tec ( ) e KMP-11 ( ), e no eixo x o percentual de positividade na pele . (B) Carga parasitária da pele. No eixo y está representado o número de am
astigotas por miligramas de pele, e no eixo x os diferentes grupos experimentais.

De modo geral, a baixa carga parasitária, assim como a baixa taxa de infecção observado na pele, principalmente em relação ao grupo controle, pode estar relacionada ao tipo de infecção/desafio experimental e tempo de acompanhamento após a infecção experimental.

Diferenças entre o desafio experimental e o natural como: número de parasitos, estágio do ciclo de vida (amastigota ou promastigota), via/local de infecção, presença ou não de saliva do vetor, dentre outras são variáveis importantes que devem ser levadas em consideração quando a infecção experimental é realizada em potenciais candidatos a uma vacina anti-LVC (Reis, *et al*., 2010). O desafio experimental pela via endovenosa com alto número de parasitos (10^7-10^8 promastigotas) parece ser o modelo de desafio mais eficiente em cães, pois promove o estabelecimento de infecções rápidas, facilitando o estudo do curso da doença, sendo este apropriado também para avaliar eficácia de drogas e também a eficácia de vacinas (Genaro, O.,1993; Ramos, *et al*., 2008; Fernandes, *et al*., 2008; Reis, *et al*., 2010; Moreno, *et al*., 2012). Entretanto, este tipo de desafio experimental pode ocultar a real eficácia vacinal, devido a possibilidade da infecção/desafio suprimir uma resposta de proteção que poderia estar presente em cães vacinados (Poot, *et al*., 2006; Peters, *et al*.,

2008, 2009). No nosso estudo foi empregado o desafio experimental por via intravenosa com $5x10^7$ promastigotas, pois desejávamos uma evolução mais rápida da doença, a fim de identificar de forma mais rápida o melhor protótipo/candidato vacinal para ser testado em ensaios clínicos de fase III em áreas endêmicas (Genaro, 1992; Moreno, *et al*., 2007; Reis, *et al*., 2010). Diferentemente, o desafio experimental intradérmico busca mimetizar o local de inoculação dos flebotomíneos (Roatt, *et al*., 2010; Aguiar-Soares, *et al*., 2014) e leva a uma infecção experimental mais branda e de evolução clínica assintomática e lenta (Paranhos-Silva, *et al*. 2003; Roatt, *et al.*, 2010; Aguiar-Soares, *et al*., 2014).

Já o desafio intravenoso não passa por uma série de etapas imunológicas de apresentação e reconhecimento antigênico que ocorrem na derme. Entretanto, infecção/desafio na "ponta da probócida" de flebotomíneos infectados ainda é um obstáculo a ser alcançado principalmente quando se trata do modelo cão.

O desafio experimental proposto pela via intravenosa induziu o desenvolvimento de uma infecção assintomática na maioria dos cães dos diferentes grupos durante os doze meses de acompanhamento após o desafio experimental (Aguiar-Soares, *et al*, 2014), tornando talvez necessário um maior tempo de acompanhamento dos animais para o aparecimento de um maior número de animais com sinais clínicos, além de maior frequência e severidade dos sinais/sintomas da doença e assim, possivelmente, uma maior carga parasitária nos tecidos alvo do parasito de *Leishmania infantum*. No estudo conduzido por Aguiar-Soares, *et al.*, (2014) foi demonstrado que os animais do grupo Controle apresentaram sinais clínicos mais exuberantes da LVC, como: emagrecimento, lesão no focinho, despigmentação da mucosa, linfadenopatia, apatia, conjuntivite. Entretanto, nenhum dos cães dos diferentes grupos, mesmo do grupo controle, apresentaram lesões de pele característica na LVC (somente um animal do grupo controle apresentou lesão no focinho). O desafio experimental pela via endovenosa muda temporalmente o quadro patológico e clínico natural de evolução da doença, fazendo com que tenhamos, primeiramente, um maior número de parasitos em órgãos alvo mais vascularizados (como baço, fígado e medula óssea) e apenas no segundo momento, após estabelecimento e aumento da carga parasitária nesses órgãos, ocorra com a evolução clínica da doença a disseminação do parasito para a pele dos animais.

Diferentemente, na infecção natural em áreas endêmicas através do repasso sanguíneo de flebótomo diretamente na pele dos cães, em que os mesmos são expostos continuamente a picadas de flebótomos e inoculações frequentes de parasitos na derme, ocorrerá o caminho e evolução natural da doença, com o desenvolvimento do quadro patológico e clínico esperado na doença, que leva ao intenso parasitismos cutâneo nos cães, com desenvolvimento frequente e característico de lesões cutâneas na pele (Reis *et al.*, 2009).

Em um estudo conduzido por Aslan e colaboradores (2016), 8 beagles foram infectados por meio de múltiplas transmissões/repasto sanguíneo do vetor *Lutzomyia longipalpis,* em que o vetor foi infectado experimentalmente com *Leishmania infantum*. Os sinais clínicos dos cães variaram, embora parasitas vivos tenham sido recuperados de todos os baços dos cães. Um achado importante foi a persistência do parasito de *Leishmania* por 6 meses nas lesões observadas nos locais do repasto sanguíneo dos vetores, em todos os cães do experimento. Além disso, as lesões reativaram após uma segunda transmissão realizada em um local distal da pele do cão, com um novo repasto sanguíneo do vetor infectado. Notavelmente, ao se realizar o xenodiagnóstico, os flebotomíneos adquiriram parasitos de *Leishmania* com eficiência ao se alimentarem nas lesões do local da picada primária. Neste estudo, através das transmissões para vetores controlados foi identificado um papel potencial na pele de cães doentes, nos locais de transmissão inicial do parasito pelo vetor para o cão, como fonte de infecção para outros vetores, fornecendo uma nova perspectiva sobre o mecanismo de transmissibilidade de *Leishmania* aos vetores flebotomíneos (Aslan *et al*., 2016).

A técnica de xenodiagnóstico no nosso estudo foi utilizada para avaliar a carga parasitária encontrada no flebotomíneo fêmea após o repasso sanguíneo em cães previamente imunizados, doze meses após o desafio experimental, a fim de avaliarmos a potência e eficácia das diferentes vacinas.

Em nosso estudo o período de pré patente foi de 6 meses, com o aparecimento de sinais clínicos sugestivos da doença (Relatório Final/bolsa PIBIC/FAPEMIG 2017/2018). O xenodiagnóstico foi feito após esse período de 12 meses afim de avaliarmos o potencial dos cães em transmitir o parasito para os flebotomíneos. Os resultados obtidos mostraram que, apenas o grupo controle não vacinado apresentou positividade (83 parasitos por

flebótomo fêmea), como mostra na Figura 2. Os grupos vacinados com os diferentes imunobiológicos não apresentaram positividade (Figuras 3, 4, 5 e 6), sendo um indicativo que no tempo experimental avaliado as vacinas foram capazes de impedir a transmissão do parasito de *L. infantum* para o inseto vetor, *L. longipalpis*, da LV.

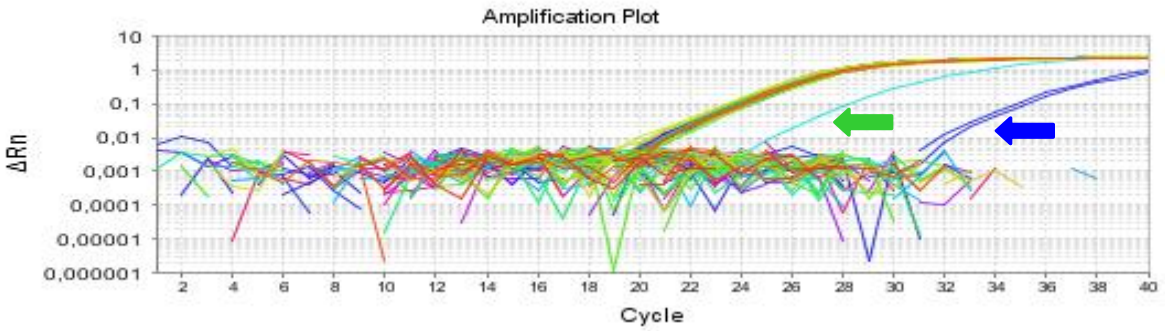

Figura 2: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Controle. A seta azul indica amplificação do DNA do parasito (carga estimada em 83 parasitos por flebótomo fêmea). A seta verde indica a amplificação do controle positivo para *Leishmania infantum* equivalente a 200 parasitos. As demais curvas representam a correta amplificação do gene de referência dos flebótomos.

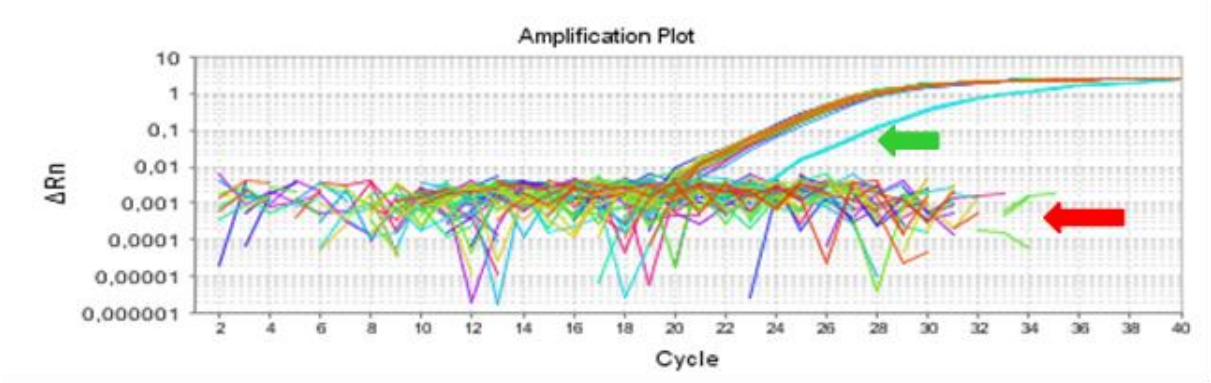

Figura 3: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo LBSap®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da figura 2

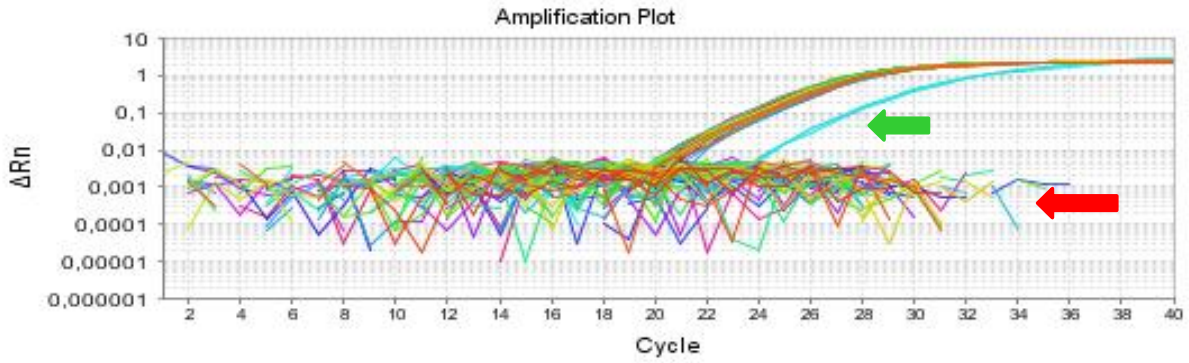

Figura 4: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Leishmune®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2.

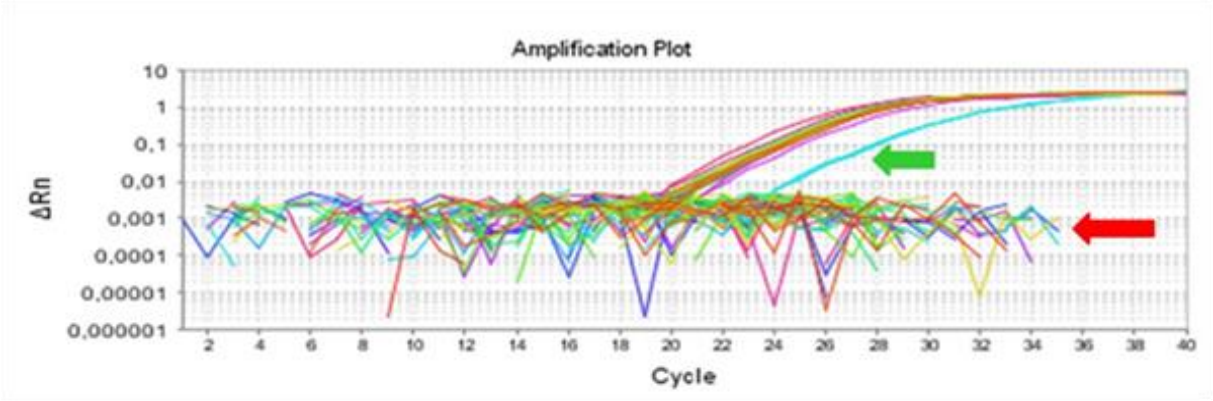

Figura 5: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo Leish-Tec®. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2.

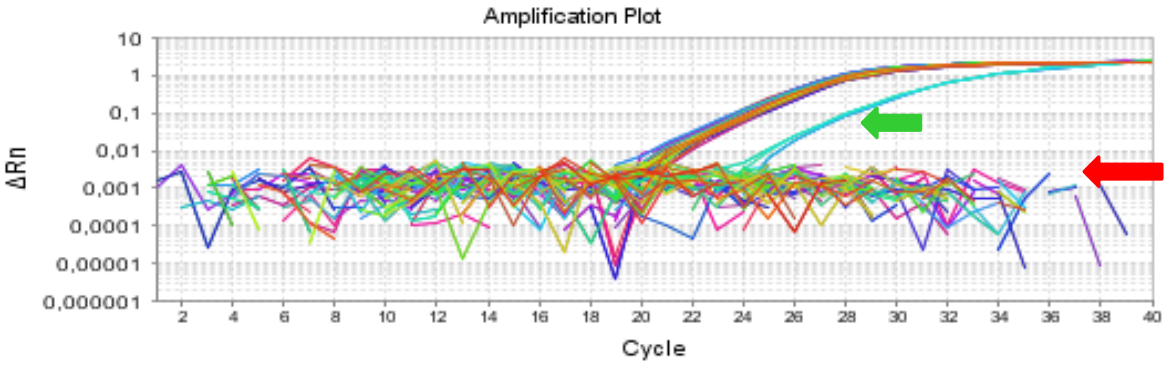

Figura 6: Resultado representativo de carga parasitária em cães do grupo KMP-11. A seta vermelha mostra que não houve amplificação do DNA do parasito. Vide explicação da Figura 2.

A infecção por *L. infantum* nos diferentes grupos vacinais apresentou perfil de positividade no xenodiagnóstico apenas no grupo Controle não vacinado (20,0%), no qual, somente um cão apresentou positividade. Sendo que, nos grupos vacinais LBSap,

Leishmune®, Leish-Tec®, KMP-11 nenhum cão apresentou positividade em nenhuma das fêmeas de flebotomíneos alimentadas na pele dos cães (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de positividade de infecção por *L. infantum* para os diferentes grupos experimentais de cães.

Grupos	Positividade (%)
LBSap	0/6 (0,0)
Leishmune®	0/6 (0,0)
Leish-Tec®	0/5 (0,0)
KMP-11	0/7 (0,0)
Controle	1/5 (20,0)

As razões na segunda coluna indicam o número de cães infectados no numerador e o tamanho amostral no denominador. A porcentagem está indicada entre parênteses.

A dinâmica natural da infecção por *L. infantum* em cães é pouco conhecida. A inoculação de parasitos por flebotomíneos é baixa (10-1.000) parasitos são injetados pela via intradérmica. Essa inoculação pode ser durante uma única ou repetitivas picadas, e o estado nutricional e as doenças concomitantes podem afetar o andamento da infecção (Warburg & Schlein, 1986). Sob tais condições variáveis, um período pré patente de cerca de 110 dias até o aparecimento de resultados positivos na sorologia anti-*Leishmania* foi estimado por Quinnel, *et al.* (1997). Estudos feitos por Abranches *et al.(*1991) indicam que, cães naturalmente infectados pode apresentar períodos pré patentes maiores que 16 meses, sem apresentar sinais clínicos da LVC.

Para que o animal seja um bom reservatório é crucial que, apresente parasitas em abundância e que sua permanência no animal seja longa, para que ocorra a infecção do flebótomo (Castro, *et al*., 2007). Entretanto, essa teoria é sustentada por evidências circunstanciais, uma das razões se dá pela localização restrita onde o vetor faz seu repasto sanguíneo, teoricamente, apenas na lesão cutânea, local onde o parasito se localiza, é capaz

de garantir a infecção por *Leishmania* ao vetor (Castro, *et al*., 2007, Madeira, *et al*., 2005, Madeira, *et al*., 2006).

Um outro fator que pode afetar o andamento do resultado é a sobrevivência dos vetores após o período de alimentação, se houver uma alta mortalidade não há tempo o suficiente para que o parasita se multiplique no trato gastrointestinal do inseto, consequentemente a detecção é dificultada. Assim, após a ingestão do sangue infectado as formas amastigotas começam a se diferenciar em promastigotas pró cíclico, que apresentam pouca mobilidade e ficam espalhadas por todo o intestino médio do flebótomo, essa fase é determinante, visto que nos primeiros 2 a 3 dias após a ingestão sanguínea as enzimas digestivas agem em seu máximo e cerca da metade dos parasitos são destruídos e eliminados com as fezes. Devido a esse fato, a visualização do parasito é dificultada e a sensibilidade do xenodiagnóstico diminui quando método é realizado após 5 dias do repasto sanguíneo (Kamhawi, *et al*., 2006; Magalhães-Junior, *et al*., 2016.). Em contrapartida, quando o xenodiagnóstico é realizado de 8 a 9 dias após o repasto sanguíneo, sua carga parasitária aumenta significativamente e ficam concentradas na parte superior do estômago, sendo mais fáceis de ser detectadas (Kamhawi, *et al*., 2006).

Levando em consideração o tipo de desafio/infecção proposta em nossa estudo, o período pré patente, a baixa frequência e número de sinais clínicos da doença no tempo de realização do xenodiagnóstico, bem como pelos resultados encontrados na avaliação da carga parasitária na pele de orelha (mesmo local onde foi realizado o xenodiagnóstico), em que evidenciamos uma baixa carga parasitária e um pequeno número de cães positivos, podem justificar a presença de apenas um cão positivo no grupo Controle no xenodiagnóstico. Outros fatores como a virulência da cepa, tempo de acompanhamento dos animais após desafio experimental, raça do animal, local exato em que o parasito estava presente na pele, podem também acarretar diretamente na evolução da doença (Reis *et al*., 2010).

Algumas variáveis como o local e tamanho/quantidade de pele coletado (podendo não ter parasitos suficiente para a detecção) ou número de flebotomíneos por pool de extração ou empregados no xenodiagnóstico, bem como variações na extração do DNA ou nos primers (kDNA - pele ou DNApolimerase - flebótomo) empregados na técnica de qPCR na pele de orelha e nos flebotomíneos do xenodiagnóstico podem estar relacionados a não

concordância dos dados encontrado entre a qPCR da pele de orelha e a qPCR do xenodiagnóstico.

De maneira geral, podemos observar nos diferentes estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (Aguiar-Soares et al., 2020; Aguiar-Soares, 2014; Relatório Final/bolsa PIBIC/FAPEMIG 2016/2017; Relatório Final/bolsa PIBIC/FAPEMIG 2017/2018) relacionados a potência/eficácia do candidato vacinal LBSap após o desafio/infecção experimental com *L.infantum* em cães, que a vacina LBSap tem se mostrado um bom candidato comparativamente entre as demais vacinas testadas. Temos demonstrado que a vacina LBSap propicia aos cães imunizados um reconhecimento e proliferação específica dos linfócitos T totais, bem como da sub-população de linfócitos T $CD8^+$, o que indica o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção por *L. infantum* e consequentemente na prevenção da LVC ou na diminuição da carga parasitária. Também já evidenciamos em cães imunizados com LBSap o aumento da capacidade de linfócitos T $CD8^+$em produzir a citocina IFN-γ+ que é relacionada ao controle do parasitismo por *Leishmania infantum* (Aguiar-Soares et al., 2020; Relatório Final/bolsa PIBIC/FAPEMIG 2016/2017). Para corroborar com esses achados e hipótese, foi observado (Aguiar-Soares, 2014; Relatório Final/bolsa PIBIC/FAPEMIG 2017/2018) que a vacina LBSap foi capaz de reduzir a carga parasitária na medula óssea 46,9 vezes em relação à carga do grupo controle. No presente projeto a única vacina que em ambas os alvos testados, tanto pele quanto nos flebotomíneos, foi negativo na qPCR para o DNA de *Leishmania*, foi o imunobiológico LBSap, apresentando 100% de proteção. Estes resultados demonstram o importante efeito da vacinação sobre a infecção por *L.infantum*, sugerindo que este imunobiológico teve ação efetiva na redução da carga parasitária na pele a valores que impossibilitaram a transmissão do parasito para o inseto vetor, como observado no xenodiagnóstico.

VI. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi possível evidenciar que a vacina LBSap foi capaz de levar a não detecção do parasito de *L.infantum* na pele de orelha dos cães, seja pela qPCR diretamente no tecido, seja indiretamente pelo xenodiagnóstico. Este resultado indica, possivelmente, que o repertório antigênicos vacinal do imunobiológico LBSap foi capaz de estimular o sistema imune após a vacinação e fazer com o sistema imune dos cães fossem capazes de reconhecer e combater a infecção contra o parasito de *L.infantum*, impedindo, até o tempo de avaliação estudado (12 meses após a infecção experimental), o aparecimento ou disseminação do parasito para a pele. A imunogenicidade vacinal, possivelmente, conseguiu reduzir ou manter controlada a replicação parasitária na pele, confirmando a habilidade da vacinação com LBSap em manter a carga parasitária em níveis baixos após a infecção experimental, ao ponto de ser capaz de bloquear a infecção para flebótomos após o repasso sanguíneo.

Dessa maneira, nossos resultados indicam que a vacina LBSap pode ser considerada um candidato vacinal a prosseguir em ensaios clínicos de Fase III duplo-cego randomizado em áreas de alta endemia para leishmaniose visceral canina, a fim de avaliarmos sua eficácia neste cenário. Os avanços científicos obtidos neste campo representam não só um passo significativo para os ensaios clínicos de fase I e II em vacinas contra leishmaniose visceral canina, mas também, um norte na obtenção e desenvolvimento de uma possível, que possa ser empregada nas medidas de controle do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIM, N., CAMPINO, L., SCHNUR, L. F., & JAFFE, C. L. (1991). *An experimental model for canine visceral leishmaniasis.* **Parasite Immunology**, *13(5), 537–550.*

ABRANTES, T. R., WERNECK, G. L., ALMEIDA, A. S. D., & FIGUEIREDO, F. B. (2018) Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de saude publica, 34(1).**

AGUIAR, G.M. & W.M. MEDEIROS. (2003). Distribuição regional e hábitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, p.207-255. **In E.F. Rangel & R. Lainson (orgs.**), Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 368p.

AGUIAR-SOARES, R.D.; ROATT, B.M.; KER, H.G.; MOREIRA, N.; MATHIAS, F.A.; CARDOSO, J.M.; GONTIJO, N.F.; BRUNA-ROMERO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; ET AL. (2014). LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4(+) and CD8(+)) as well as a reduction of parasitism after challenge with Leishmania infantum plus salivary gland of Lutzomyia longipalpis. **Parasit. Vectors 2014, 7, 61.**

AGUIAR-SOARES, R.D.O., ROATT, B.M., MATHIAS, F.A.S., REIS, L.E.S., CARDOSO, J.M.O., BRITO, R.C.F., KER, H.G., CORRÊA-OLIVEIRA, R., GIUNCHETTI, R.C., REIS, A.B. (2020). Phase I and II Clinical Trial Comparing the LBSap, Leishmune®, and Leish-Tec® Vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis. **Vaccines (Basel).Nov 17;8(4):690**. doi: 10.3390/vaccines8040690.

ALMEIDA, A.B.P.F., MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F. (2010). Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural. Santa Maria**, v. 40, n. 7, p. 1610-1615.

ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J., (2004). Canine leishmaniasis. Adv. **Parasitol. 57, 1–88**.

ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., ET AL. (2004). Canine leishmaniasis. Adv**. Parasitol. 57, 1-88.**

ALVAR, J., YACTAYO, S., & BERN, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology, 22(12),** 552–557. doi:10.1016/j.pt.2006.09.004

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M. (2006). Who Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence**. PLoS One. 2012;7(5):e35671.**

AMEEN, M. (2010). Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology, 35(7), 699–705.**

ANDRADE, A.J., DANTAS-TORRES, F. (2010**).** Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil**. Neotrop Entomol. 39(1):115-23.**

ASLAN, H.; OLIVEIRA, F.; MENESES, C.; CASTROVINCI, P.; GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; DERENGE, C.A.; ORANDLE, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; FISCHER, L.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI, S. (2016)**.** New Insights Into the Transmissibility of Leishmania infantum From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. **.J Infect Dis.** Jun 1;213(11):1752-61.

AZEVEDO P.C.B., LOPES G.N., FONTELES R.S., VASCONCELOS G.C., MORAES J.L.P., REBELO J.M.M. (2011). The effect of fragmentation on Phlebotomine communities (Díptera: Psychodidae) in areas of Ombrophilous Forest in São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**, 40(2):271-277.

BONGIORNO, G., PAPARCONE, R., MANZILLO, V. F., OLIVA, G., CUISINIER, A.-M., & GRADONI, L. (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in Phlebotomus perniciosus fed on Leishmania infantum infected dogs—A preliminary xenodiagnosis study. **Veterinary Parasitology**, 197(3-4), 691–695.

BORJA-CABRERA, G. P., CORREIA PONTES, N. N., DA, S., et al. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine 20**, 3277-3284.

BRAGA, M. D., COELHO, I. C., POMPEU, M. M., EVANS, T. G., MACAULLIFE, I. T., TEIXEIRA, M. J., & LIMA, J. W. (1998). Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 31, 419-424.

BRAVO, N., MUÑOZ, C., NAZAL, N., SAAVEDRA, M., MARTÍNEZ, G., ARAYA, E., … ZULANTAY, I. (2012). Real-Time PCR in faecal samples of Triatoma infestans obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. **Parasites & Vectors**, 5(1), 59

CARCELÉN, J., INIESTA, V., FERNÁNDEZ-COTRINA, J., SERRANO, F., PAREJO, J. C., CORRALIZA, I., … GÓMEZ-NIETO, C. (2009). The Chimerical Multi-Component Q protein from Leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental Leishmania infantum infection. **Vaccine**, 27(43), 5964–5973

CARRILO ET AL., (2008). Immunogenicity of HSP-70, KMP-11, PFR-2 leishmanial antigens in experimental model of canine visceral leishmaniases. **Vaccine** 26, 1902-1911.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; ROCHA, A.C.V.M.; GONTIJO, C.M.F. (2008) Naturally infected Lutzomyia sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil.**Vector Borne Zoonotic Dis**, 8: 407-414.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., BOELAERT, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, 5(11), 873–882.

ČIKOŠ, Š., BUKOVSKÁ, A., & KOPPEL, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis**. BMC Molecular Biology,** 8(1), 113.

COSTA, D. J., CARVALHO, R. M. DE A., ABBEHUSEN, M., TEIXEIRA, C., PITOMBO, M., TRIGO, J., BRODSKYN, C. (2013). Experimental Infection of Dogs with Leishmania and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, 8(4), e60535.

COSTA, D. N. C. C., Bermudi, P. M. M. B., Rodas, L. A. C., Nunes, C. M., Hiramoto, R. M., Tolezano, J. E., … Chiaravalloti-Neto, F. (2018). Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures**. Revista de Saúde Pública**, 52, 92.

COTRINA, F., J., INIESTA, V., MONROY, I., BAZ, V., HUGNET, C., MARAÑON, F., ALONSO, C. (2018). A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis**. Vaccine,** 36(15), 1972–1982.

COURA-VITAL, W., REIS, A.B., REIS, L.E., BRAGA, S.L., ROATT, B.M., AGUIAR-SOARES, R.D., MARQUES, M.J., VELOSO, V.M., CARNEIRO, M. (2013). Vet Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Parasitol.** Nov 8;197(3-4):411-7.

COURTENAY, O., QUINNELL, R. J., GARCEZ, L. M., SHAW, J. J., & DYE, C. (2002). Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, 186(9), 1314–1320.

COURTENAY, O., CARSON, C., CALVO-BADO, L., GARCEZ, L. M., & QUINNELL, R. J. (2014). Heterogeneities in Leishmania infantum Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(1), e2583.

DA COSTA-VAL, A.P., CAVALCANTI, R.R., DE FIGUEIREDO GONTIJO, N., MICHALICK, M.S., ALEXANDER, B., WILLIAMS, P., MELO, M.N., (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis infectivity. **Vet J** 174, 636-643

DA SILVA, V.O., BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA PONTES, N.N., PARAGUAI DE SOUZA, E., LUZ, K.G., PALATNIK, M., et al. (2001). A Phase III trial of Efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante,RN). **Vaccine**;19:1068—81

DE ALMEIDA FERREIRA, S., LEITE, R. S., ITUASSU, L. T., ALMEIDA, G. G., SOUZA, D. M., FUJIWARA, R. T., MELO, M. N. (2012). Canine Skin and Conjunctival

Swab Samples for the Detection and Quantification of Leishmania infantum DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6(4), e1596 .

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

DEANE, L.M. (1956) Leishmaniose visceral no Brasil, Rio de Janeiro**. Serviço Nacional de Educação Sanitária**.

DE BRITO, R.C.F; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARDOSO, J.M.O.; COURA-VITAL, W., ROATT, B.M., REIS, A.B. (2020) Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. **Appl Microbiol Biotechnol**. Oct;104(19):8105-8116.

DESJEUX, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol. Microbiol. **Infect. Dis**. 27, 305-318.

DE MENDONÇA, L. Z., RESENDE, L. A., LANNA, M. F., AGUIAR-SOARES, R. D. DE O., ROATT, B. M., CASTRO, R. A. DE O. E, GIUNCHETTI, R. C. (2016). Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, 9(1).

DYE, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. Am. J**. Trop. Med**. Hyg. 55, 125-130.

FERNANDES, A. P., COSTA, M. M., COELHO, E. A., MICHALICK, M. S., DE FREITAS,E., MELO, M. N., LUIZ TAFURI, W., RESENDE, D. DE M., HERMONT, V., ABRANTES,C. DE F., GAZZINELLI, R. T. (2008). Protective immunity against challenge with Leishmania(Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine, Elsevier.** 26,5888-95 .

FERNANDES, C. B., JUNIOR, J. T. M., DE JESUS, C., SOUZA, B. M. P. DA S., LARANGEIRA, D. F., FRAGA, D. B. M.; BARROUIN-MELO, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine,** 32(11), 1287–1295.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M. (1988) Identification *of Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immuneperoxidase staining. Research Veterinary Science, v. 44, n. 2, p. 194-196.

FRANÇA-SILVA, J.C., BARATA, COSTE, R.T., MONTEIRO, E.M., MACHADO-COELHO, G.L.L., VIEIRE, E.P., PRATA, A., MAYRINK, W., NASCIMENTO, E., FORTES-DIAS, C.L., SILVA, J.C., DIAS, E.S.(2005) Importance of Lutzomyia longipalpis in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitol**, 131: 213-220.

GALATI, E.A. B. (2003) Classificação de Phlebotominae. In: Rangel, Elizabete F.; Lainson, Ralph (Org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de janeiro: Fiocruz; p: 23-51.

GALVIS-OVALLOS, F., DA SILVA, M. D., BISPO, G. B. DA S., DE OLIVEIRA, A. G., NETO, J. R. G., MALAFRONTE, R. DOS S., & GALATI, E. A. B. (2017). Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo:Pintomyia fischerias potential vector ofLeishmania infantum. **Parasite,** 24, 2.

GEBRE-MICHAEL, T., MALONE, J. ., BALKEW, M., ALI, A., BERHE, N., HAILU, A., & HERZI, A. . (2004). Mapping the potential distribution of Phlebotomus martini and P. orientalis (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. **Acta Tropica**, 90(1), 73–86.

GENARO, O. (1993) - Leishmaniose visceral canina experimental., Belo Horizonte, (Tese de Doutoramento - **Instituto de Cięncias Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais)**.

GENARO, O. Parasitologia Humana. 10ª edição, **Atheneu S.A, São Paulo,** p. 56-60, 2002.

GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O., et al. (2007). Immunogenicity of a killed Leishmania vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine, Elsevier,** 25, 7674-7686.

GIUNCHETTI, R. C., W. MAYRINK, C.M. CARNEIRO, R. CORREA OLIVEIRA, O.A. MARTINS-FILHO, M.J. MARQUES, W.L. TAFURI, A.B. REIS. (2008b) Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.,** 84 , pp. 269-277

GIUNCHETTI, R. C., CORREA-OLIVEIRA, R., et al. (2008c). A killed Leishmania vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. **Vaccine** 26, 623-638.

GIUNCHETTI, R.C., REIS, A.B., DA SILVEIRA-LEMOS, D., MARTINS-FILHO, O.A., CORREA-OLIVEIRA, R., BETHONY, J., VALE, A.M., DA SILVA QUETZ, J., BUENO, L.L., FRANCA-SILVA, J.C., NASCIMENTO, E., MAYRINK, W., FUJIWARA, R.T. (2008d). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.,** 85, 106–112.

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

GRADONI, L., *et al*. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. **Vet. Parasitol**. 100, 87-103.

GRADONI, L., *et al*.(2015). Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. **Vet. Parasitol**.
208, 94–100.

GUARGA, J.L., MORENO, J., LUCIENTES, J., GRACIA, M.J., PERIBANEZ, M.A., ALVAR, J., CASTILLO, J.A.(2000). Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity

amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Res. **Vet. Sci.** 69, 249–253.

GUARGA, J. L., LUCIENTES, J., PERIBÁÑEZ, M. A., MOLINA, R., GRACIA, M. J., & CASTILLO, J. A. (2000). Experimental infection of Phlebotomusperniciosus and determination of the natural infection rates of Leishmaniainfantum in dogs. **Acta Tropica**, 77(2), 203–207.

KAMHAWI, S, *et al*. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, 22(9).

LAINSON, R.; SHAW, J. J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v. 1. 1a ed. Londres: Academic Press, cap. 7, p. 291-364.

LAISON, R.; RANGEL, E. F. (2005). Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - **A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 100, n. 8, p. 811-827.

LARA-SILVA, F.O., MICHALSKY, E.M., FORTES-DIAS, C.L., FIUZA, V.O.P., PESSANHA, J.E.M., REGINA-SILVA, S., de AVELAR, D.M., SILVA, M.A., LIMA, A.C.V.M.R., da COSTA, A.J.A., MACHADO-COELHO, G.L.L., DIAS, E.S., (2015). Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, volume 148, August, 2015, p. 128-136.

MADEIRA, M. F. et al. (2005). Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitology Research**, 97(1): 73-76.

MADEIRA, M. F. et al. (2006a) Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Leishmania (Leishmania) chagasi in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100(5): 442-445.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T., MOTA, T. F., PORFIRIO-PASSOS, G., LARANGEIRA, D. F., FRANKE, C. R., & BARROUIN-MELO, S. M. (2016). Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, 223, 120–126.

MANNA, L., VITALE, F., REALE, S., CARACAPPA, S., PAVONE, L. M., MORTE, R. D., GRAVINO, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis**. Veterinary Parasitology**, 125(3-4), 251–262.

MANCIANTI, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., (1988). Studies on canine leishmaniais control. I. Evolution of infection of different clinical

forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. R. **Soc. Trop. Med. Hyg**. 82, 566–567.

MARCONDES, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America**. Research in Veterinary Science.**

MENEZES, J.A., FERREIRA, E. de C., ANDRADE-FILHO, J.D., DE SOUSA, A.M., MORAIS, M.H.G., ROCHA, A.M.S., *et al*. (2015) An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission. **Biomed Res Int**., 2015:621854.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005). Nota Técnica Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishimune® 29/07/2005, Brasília. **Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf**. Acesso em 10/0

/MINISTERIO DA SAÚDE (2007), **Instrução Normativa Interministerial**, número 31[IN-31] 09/07/2007, Brasília, Brasil.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009), Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, **Secretaria de vigilância em saúde**, Brasília, Brasil. 120p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas anti-leishmaniose visceral canina registradas no **MAPA** (03/05/2009), Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_esclarecimento.pdf. Acesso em 10/02/2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2014), Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, **Secretaria de vigilância em saúde**, Brasília, Brasil, p 59.

MODI G.B.; TESH, R.B. (1983). A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory.J **Med Entomol** 20: 568-569.

MORENO, J., VOULDOUKIS, I., MARTIN, V., MCGAHIE, D., CUISINIER, A.-M., & GUEGUEN, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. PLoS Neglected **Tropical Diseases**, 6(6), e1683.

MORENO, J., *et al.* (2019).Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. **Front Vet Sci.** 2019 Jun 4;6:168. eCollection.

MORTAZAVIDEHKORDI, N., FALLAH, A., ABDOLLAHI, A., KIA, V., KHANAHMAD, H., NAJAFABADI, Z. G., HEJAZI, S. H. (2018). A lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein increases immune response to Leishmania major in BALB/C. **Parasitology Research**, 117(7), 2265–2273.

MOURYA D, GOKHALE, M, KUMAR, R. (2007) Xenodiagnosis: use of mosquitoes for the diagnosis of arboviral infections. **J Vector Borne Dis**. 44(4):233–40. PMID: 18092528

NOLI, C. & AUXILIA, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review**. Vet. Dermatol**. 16, 213-232.

OLIVA, G., NIETO, J., FOGLIA MANZILLO, V., CAPPIELLO, S., FIORENTINO, E., DI MUCCIO, T., … GRADONI, L. (2014). A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two Leishmania infantum Transmission Seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(10), e3213.

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

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., GOMES, E.M., PARAGUAI-DE-SOUZA, E., LUZ, K., PALATNIK, M., BOROJEVIC, R. (1995). Leishmania donovani: titration of antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. Trans **RSoc Trop Med** Hyg;89:390—3.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., DOS SANTOS, W. R., FRANCA-SILVA, J. C., DA COSTA, R. T., REIS, A. B., PALATNIK, M., MAYRINK, W., & GENARO, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am. J. **Trop. Med**. Hyg. 65, 510-517.

PARANHOS-SILVA M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DE SA-OLIVEIRA, G.G.; NASCIMENTO, E.G; DOS-SANTOS, W.L. (2001). Skin reactions to thimerosal and Leishmania in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2001 Jul;96(5):679-81.

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

POOT, J. *et al*. (2006) Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with Leishmania infantum.**Vaccine** 24, 2460–2468.

PRATS, N.; FERRER, L. (1995) A possible mechanism in the pathogenesis of cutaneous lesions in canine leishmaniasis. **Vet Rec** 134:103– 104

QUINNELL, R. J., & COURTENAY, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 136(14), 1915.

QUINNELL, R. J., COURTENAY, O., GARCEZ, L. AND DYE, C. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology** 115, 143–156.

RAMOS, I.; *et al*. (2008) Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant.

READY, P., *et al*. (2013) Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Rev Entomology**, 58: 227-250.

REGINA-SILVA, S., Feres, A. M. L. T., França-Silva, J. C., Dias, E. S., Michalsky, É. M., de Andrade, H. M., Machado-Coelho, G. L. L., *et al.* (2016). Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec ® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, 34(19), 2233–2239.

REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., CORRÊA-OLIVEIRA, R. (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128(1-3), 87–95.

REIS, A. B.,*et al*. (2010). Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. Trends Parasitology, **Review. Trends Parasitol.** 2010 Jul;26(7):341-9.

ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. DE O., VITORIANO-SOUZA, J., COURA-VITAL, W., BRAGA, S. L., CORRÊA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B. (2012). Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with L. infantum and Saliva of Lu. longipalpis: Immunogenicity and Parasitological Evaluation**. PLoS ONE**, 7(11), e49780.

ROATT, B. M., AGUIAR-SOARES, R. D. DE O., VITORIANO-SOUZA, J., COURA-VITAL, W., BRAGA, S. L., CORRÊA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B. (2012). Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with L. infantum and Saliva of Lu. longipalpis: Immunogenicity and Parasitological Evaluation**. PLoS ONE**, 7(11), e49780.

SACKS, D.; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. (2001) Annu. **Rev. Microbiol**., v. 55, p. 453-483.

SALOMÓN O. D., FELICIANGELI M. D., QUINTANA M. G., AFONSO M. M., RANGEL E. F. (2015) *Lutzomyia longipalpis* urbanization and control. **Mem Inst Oswaldo** Cruz . 110(7):831-46.

SANTOS-SILVA, J., CARANHA, L., MOURA SANTOS, F.K., *et al*. (2017). Sand fly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) abundance and diversity in areas affected by the São Francisco River transposition project in Ceará State, Brazil. **Parasites Vectors** 10, 403.

SARAIVA, L., REIS, A. S., RUGANI, J. M. N., PEREIRA, A. A. S., RÊGO, F. D., DA ROCHA, A. C. V. M., & ANDRADE FILHO, J. D., *et al.* (2015). Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil. **PloS one,** 10(8), e0134845.

SCHENONE, H., *et al.* (1999). Xenodiagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 289-294

SHERLOCK, I.A., *et al* (2003) Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz,** 15-21.

SINGH OP, HASKER E, BOELAERT M, SACKS, D.; SUNDAR, S. (2020) Xenodiagnosis to address key questions in visceral leishmaniasis control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis** 14(8): e0008363.

SOLANO-GALLEGO, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., & FERRER, L. (2001). Prevalence of Leishmania infantum Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(2), 560–563.

SOUZA, C.M.; PESSANHA, J.E.; BARATA, R.A.; MONTEIRO, E.M.; COSTA, D.C.; DIAS, E.S. (2004.) Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99: 795-803.

TESH, R.B., *et al.* (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am. J. **Trop. Med. Hyg**., v.52, p. 287-292

TRAVI, L.B.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. (2001). Canine Visceral Leishmaniasis In Colombia: Relationship Between Clinical And Parasitologic Status And Infectivity For Sand Flies. Am. J. **Trop. Med. Hyg.,** 64(3, 4), 2001, pp. 119–124.

TOEPP, A., LARSON, M., WILSON, G., BENNETT, C., LEAL-LIMA, A., ANDERSON, B., PETERSEN, C. (2018). Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess Leishmania vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. **Vaccine.**

VELEZ, R., & GÁLLEGO, M. (2020). Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health.**

XAVIER, S. C., ANDRADE, H. M., HADAD, S. J., CHIARELLI, I. M., LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, 2(1), 17. doi:10.1186/1746-6148-2-17

WERNECK, G. L., *et al.* .(2008). Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de saude publica**, 24, 2937-2940.

SCHLEIN, Y.; & WARBURG, A., *et al.* (1986). Phytophagy and the Feeding Cycle of Phlebotomus Papatasi (Diptera: Psychodidae) Under Experimental Conditions1. **Journal of Medical Entomology, 23**(1), 11–15.

WORLD HEALT ORGANIZATION (WHO). Consultado em 06/2010 [online]. Disponível em: http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm

ANEXOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2010/71, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Avaliação da toxicidade, imunogenicidade e eficácia das vacinas Leishmune, Leish-Tec, KMP-11 e LBSap em uma plataforma de bioprospecção para validar uma potencial vacina contra leishmaniose visceral canina em ensaio clínico vacinal de Fase I e II*" e que tem como responsável o Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em dezembro/2013.

Ouro Preto, 26 de abril de 2011.

Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP