



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia – EF

Departamento de Análises Clínicas - DEACL



BÁRBARA VASCONCELOS VASQUES

Avaliação da imunogenicidade através do sistema de cocultivo celular de cães vacinados com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune[®] e Leish-Tec[®]

Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Co-orientadora: Nívia Carolina Nogueira de Paiva

Ouro Preto, MG

2022

BÁRBARA VASCONCELOS VASQUES

Avaliação da imunogenicidade através do sistema de cocultivo celular de cães vacinados com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune[®] e Leish-Tec[®]

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como exigência parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Coorientadora: Nívia Carolina Nogueira de Paiva

Ouro Preto, MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

V335a Vasques, Barbara Vasconcelos.

Avaliação da imunogenicidade através do sistema de cocultivo celular de cães vacinados com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune e Leish-Tec. [manuscrito] / Barbara Vasconcelos Vasques. Bárbara Vasconcelos Vasques Vasques. - 2022.

60 f.: il.: color., mapa. + Quadro.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares.

Coorientadora: Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose Visceral. 2. Vacinas. 3. Imunogenicidade da Vacina. I. Vasques, Bárbara Vasconcelos Vasques. II. Paiva, Nívia Carolina Nogueira de. III. Soares, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. 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 ANÁLISES CLÍNICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Bárbara Vasconcelos Vasques

Avaliação da imunogenicidade em cães vacinados com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® através do sistema de cocultivo celular

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 junho de 2022

Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Guilherme de Paula Costa - Universidade Federal de Ouro Preto
Ma. Ana Flávia Pereira 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 14/10/2022



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/10/2022, às 17:52, 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 **0412589** e o código CRC **04C7BC33**.

Este trabalho é dedicado aos meus pais,

Rejane e Marco Aurélio,
pilares da minha formação.

RESUMO

O comportamento emergente e reemergente da leishmaniose visceral tem se atribuído a fatores relacionados ao cão, principal reservatório doméstico do parasito e mantenedor da transmissão. Não há alternativas terapêuticas capazes de conduzir a cura parasitológica duradoura em cães infectados e conseqüentemente reverter o papel de reservatório no ciclo de transmissão. No Brasil, o controle da leishmaniose visceral tem como objetivo a redução dos casos de leishmaniose visceral humana e canina, no entanto, tais medidas não têm logrado êxito na diminuição da incidência da doença. Considerando o destaque de cães no contexto epidemiológico da leishmaniose visceral, a imunoprofilaxia canina surge como melhor alternativa para o controle da doença. Entretanto, até o momento, ainda não existem vacinas empregadas no âmbito do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde para fins de saúde pública, justificada pela escassez de estudos de Fase I, II e, principalmente, de Fase III que comprovem a inocuidade/toxicidade, imunogenicidade e eficácia. Para reverter este cenário, é de fundamental importância ampliar o espectro de metodologias voltadas à avaliação de ensaios vacinais de Fase I, II e III. Desta forma, o presente estudo avaliou de forma comparativa a imunogenicidade vacinal em cães vacinados com os diferentes imunobiológicos LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP-11 em um ensaio clínico vacinal de Fase I e II. Para isso, foi feita uma análise comparativa da taxa e carga de infecção de macrófagos sozinhos ou cocultivados com linfócitos T autólogos (CD4⁺ e/ou CD8⁺) pelo parasito de *L.infantum in vitro*, no contexto do cocultivo de células do sangue periférico obtidas de cães após o processo de vacinação com os diferentes imunobiológicos. Foi observado que todos os imunobiológicos foram capazes de reduzir a carga parasitária e a frequência de macrófagos infectados, sejam esses sozinhos ou em sistema de cocultivo com linfócitos T autólogos. Sendo assim, o presente estudo favorece a análise de aspectos relacionados a imunogenicidade e proteção induzidos logo após o protocolo vacinal em cães, e auxilia a triagem de possíveis candidatos vacinais.

Palavras-chave: Vacinas, Leishmaniose Visceral Canina, LBSap, KMP-11, Leish-Tec[®], Leishmune[®].

ABSTRACT

The emergent and re-emerging behavior of visceral leishmaniasis has been attributed to factors related to the dog, which is the main domestic reservoir of the parasite and maintainer of transmission. There are no therapeutic alternatives capable of leading to a lasting parasitological cure in infected dogs and, consequently, reversing the role of reservoir in the transmission cycle. In Brazil, the control of visceral leishmaniasis aims to reduce cases of human and canine visceral leishmaniasis, however, it has not been successful in reducing the incidence of the disease. Considering the importance of dogs in the epidemiological context of visceral leishmaniasis, canine immunoprophylaxis seems to be the best alternative for controlling the disease. However, there are still no vaccines used under the Ministry of Health's LV surveillance and control program for public health purposes, justified by the scarcity of Phase I, II and, mainly, Phase III studies that prove the innocuity/toxicity, immunogenicity and efficacy. To reverse this scenario, it is fundamental to expand the spectrum of methodologies aimed at evaluating Phase I, II and III vaccine trials. Thus, the present study comparatively evaluated the vaccine immunogenicity in dogs vaccinated with the different immunobiologicals LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] and KMP-11 in a Phase I and II vaccine clinical trial. For this, a comparative analysis of the infection rate and load of macrophages alone or cocultured with autologous T lymphocytes (CD4⁺ and/or CD8⁺) by the *L. infantum* parasite *in vitro* was performed, in the context of coculture of cells of the peripheral blood obtained from dogs after the process of vaccination with different immunobiologicals. It was observed that all immunobiologicals were able to reduce the parasite load and the frequency of infected macrophages, either alone or in a coculture system with autologous T lymphocytes. Therefore, the present study favors the analysis of aspects related to immunogenicity and protection induced soon after the vaccination protocol in dogs, and helps the screening of possible vaccine candidates.

Keywords: Vaccines, Canine Visceral Leishmaniasis, LBSap, KMP-11, Leish-Tec[®], Leishmune[®].

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
μL	Microlitro
ASLi	Antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
CA	Cães assintomáticos
CD3 ⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T totais
CD4 ⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD5 ⁺	Marcador de superfície celular de linfócitos T
CD8 ⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
CD21 ⁺	Marcador de superfície de linfócitos B
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CNI	Cães não infectados
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Cães sintomáticos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
g	Constante gravitacional
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-10 Interleucina 10
IL-12 Interleucina 12
IL-13 Interleucina 13
IL-17 Interleucina 17
iNOS Óxido nítrico sintase induzida
KMP-11 Antígeno recombinante da proteína de membrana da ordem Kinetoplastida de 11 kDa
LBSap Vacina de antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante saponina
LC Leishmaniose cutânea
LIT *Liver Infusion Tryptose* (meio de cultura)
LMC Leishmaniose mucocutânea
LV Leishmaniose visceral
LVC Leishmaniose visceral
LVH Leishmaniose visceral humana
M ϕ Macrófago
M-CSF Fator estimulador de colônias de macrófagos
MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg Miligrama
mL Mililitro
mRNARNAs mensageiros
MS Ministério da Saúde
NNN/LIT *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de cultivo celular)
NO Óxido nítrico
OMS Organização Mundial de Saúde
OP46 Cepa de *Leishmania infantum* OP46
PBS *Phosphate buffer saline* (tampão de fosfato salina)
PCR Reação em cadeia da polimerase
PVCLV Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR PCR em tempo real
RNA Ácido ribonucleico
ROS *Reactive oxygen species*
RPMI *Roswell Park Memory Institute* (Meio de cultivo celular)

SFB Soro fetal bovino

TGF- β Fator de transformação do crescimento beta

T_h1 Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

T_h2 Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- α Fator de necrose tumoral- α

UFOP Universidade Federal de Ouro Preto

WHO World Health Organization (OMS)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	Leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina	10
2.2	Resposta imune na leishmaniose visceral canina.....	15
2.3	Detecção e diagnóstico da leishmaniose visceral canina	16
2.4	Estratégias de controle e tratamento quimioterápico na leishmaniose visceral canina	17
2.5	Ferramentas para avaliação da imunogenicidade e eficácia vacinal	18
2.6	Vacinas para a leishmaniose visceral canina	22
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo Geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	METODOLOGIA.....	29
5.1	Grupos experimentais	29
5.2	Delineamento experimental e abordagens investigativas	29
5.3	Sistema de cocultivo celular.....	30
5.3.1	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	30
5.3.2	Condições de cultivo para derivação de monócitos circulantes em macrófagos	31
5.3.3	Purificação de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	31
5.3.4	Preparo de promastigotas de <i>L. infantum</i> e parâmetros de avaliação	33
5.4	Análises estatísticas.....	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1	Análise <i>in vitro</i> da imunogenicidade e da potência vacinal no sistema de cocultivo	35

6.1.1 Avaliação de macrófagos de cães vacinados infectados por <i>L. infantum</i> , na ausência de linfócitos T.....	36
6.1.2 Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4 ⁺ com macrófagos infectados por <i>L. infantum</i>	38
6.1.3. Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD8 ⁺ com macrófagos infectados por <i>L. infantum</i>	41
6.1.4 Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ com macrófagos infectados por <i>L. infantum</i>	42
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO 1.....	58

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais severa da doença (BRASIL, 2019; OPAS/OMS, 2019), encontra-se em amplo processo de expansão nas diferentes regiões do Brasil e do mundo (ALVAR *et al.*, 2012), e o aumento da prevalência desta zoonose é indicativo de um grave problema de saúde pública (TRAVI *et al.*, 2018).

Na leishmaniose visceral canina (LVC) os cães constituem o principal reservatório do parasito, transmitido através de flebotomíneos fêmeas infectados (SEVÁ *et al.*, 2016). O controle da forma clínica da LV é dependente de uma ação eficaz contra os vetores e reservatórios animais. Dado que as atuais opções de tratamento e medidas de controle da LVC não são totalmente eficazes, destaca-se a adoção da imunoprofilaxia. As vacinas podem induzir imunidade e impedir a dispersão do parasito, afastando o desenvolvimento da doença canina (MORENO, 2019; REIS *et al.*, 2010). Os trabalhos de vacinas anti-LV são baseados em ensaios de Fase I e II com modelos experimentais murino ou canino (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2010). Vale ressaltar que não há ainda uma estratégia padronizada que favoreça a rápida seleção de candidatos vacinais no modelo cão (VIANA, 2012). Neste sentido, é altamente relevante o emprego de estratégias metodológicas em estudos de Fase I e II para investigação da inocuidade, imunogenicidade e potência vacinal que possa direcionar os candidatos vacinais a ensaios clínicos de Fase III. Logo, torna-se imprescindível a adoção de novas ferramentas, como o sistema de cocultivo proposto neste estudo, para monitorar perfis e alterações imunológicas e assim fornecer informações em intervenções terapêuticas e vacinais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina

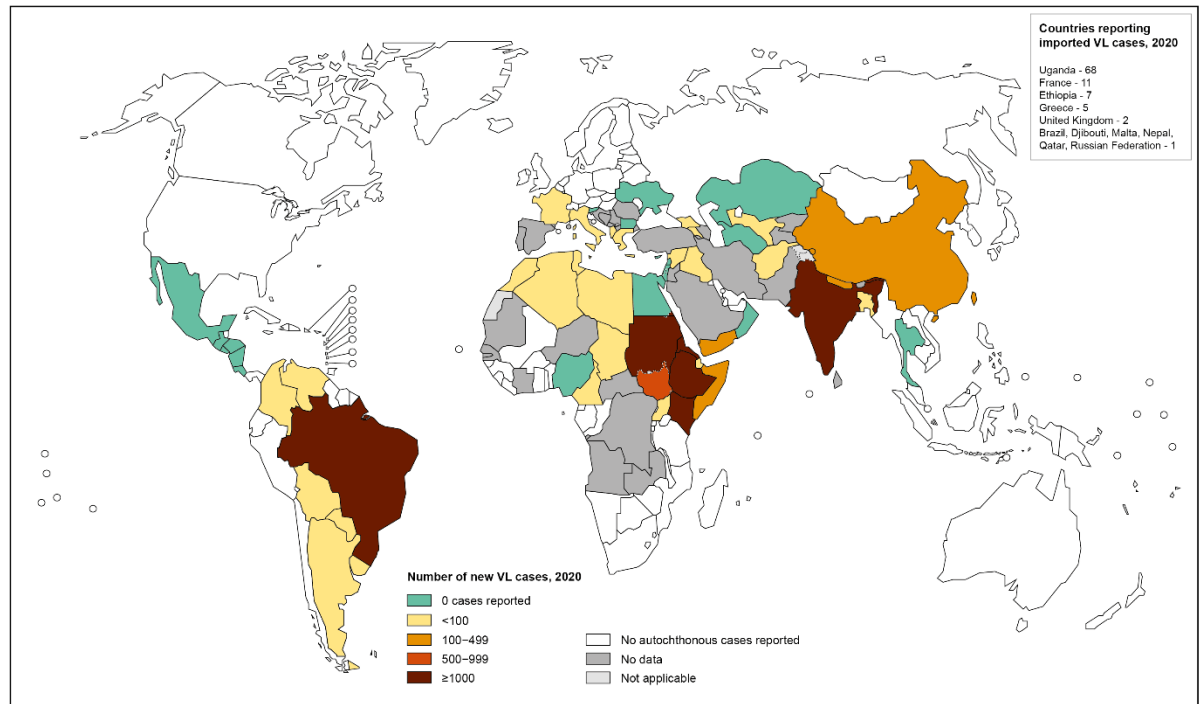
As leishmanioses englobam um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Manifesta-

se em três diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar, que ocasiona lesões na pele; leishmaniose cutâneo mucosa (LMC), que afeta tecidos nasofaríngeos; leishmaniose cutânea difusa; e leishmaniose visceral (LV) ou calazar, causando sintomas sistêmicos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; WHO, 2022a; WHO, 2022b). A Organização Pan-Americana da Saúde estima que, a nível global, há mais de 12 milhões de pessoas infectadas, de 20.000 a 30.000 mortes e 350 milhões de pessoas com o risco de contrair a doença (PAHO/WHO, 2022). A LV é a forma mais grave e letal da doença, cujos novos casos notificados ocorrem, em sua maioria, no Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (PAHO/WHO, 2022).

Os países da América Latina registram, anualmente, uma média de 55.000 casos de LC e LMC, 3.500 casos de LV que possui uma taxa média de 7% de letalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o Brasil como um país endêmico. Em 2020, foram registrados 16.056 e 1.954 casos de LC e LV, respectivamente (WHO, 2020). A LV é a forma clínica mais severa que, quando não tratada, pode levar à óbito. O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) foi implantado pelo Ministério da Saúde (MS), e baseia-se no diagnóstico precoce, tratamento, controle de vetores e recomendação da eutanásia do reservatório canino – reduzindo, dessa forma, as taxas de letalidade e transmissibilidade da doença. Ainda assim, no período de 2001 a 2017, 96% dos casos de LV na América Latina concentraram-se no Brasil (BRASIL, 2019; OPAS/OMS, 2019). De acordo com o Guia de Vigilância em Saúde, a LV encontra-se em processo de expansão urbana há anos (Figura 1), com ocorrência de surtos nas cidades do Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e de epidemias nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2019). Em 2018, Michelin e colaboradores observaram que a distribuição da LVC em uma região endêmica de São Paulo estava associada à fatores como faixa etária, raça e sinais clínicos, destacando a necessidade da intensificação de medidas de controle e prevenção da zoonose (MICHELIN *et al.*, 2018). Uma vez que o aumento da prevalência de LV é um problema de saúde pública em diferentes

estados brasileiros, torna-se imprescindível a adoção de estratégias efetivas e focadas na prevenção e controle da doença (SEVÁ *et al.*, 2016).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1: Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2020).

A leishmaniose visceral é causada por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* (MICHELIN *et al.*, 2018). Nas regiões da Ásia e África Oriental, a doença é ocasionada por *Leishmania donovani*, sendo considerada de transmissão antroponótica, ou seja, de humanos para humanos. A LV causada por *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi* (espécies sinónimas) é, por sua vez, considerada de transmissão zoonótica, de cães para humanos, e encontra-se principalmente na América Latina, Ásia Central e Mediterrâneo (ALVES *et al.*, 2018; DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018). No Brasil, são descritas as espécies *Lutzomyia cruzi* e, de maior importância, *Lutzomyia longipalpis*, responsável pela transmissão de *Leishmania infantum* (MICHELIN *et al.*, 2018).

A LVC é provocada pela infecção por *Leishmania infantum* em cães, principal reservatório do parasito, e é responsável por causar reações imunológicas e apresentar sinais clínicos como linfadenopatia, anemia, diarreia, alopecia, dermatite, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção e/ou conjuntivite (CIARAMELLA *et al.*, 1997; SEVÁ *et al.*, 2016). A picada de flebotomíneos fêmeas infectados (*Lutzomyia longipalpis*) é responsável pela transmissão de *L. infantum* (SEVÁ *et al.*, 2016), parasitos intracelulares obrigatórios do sistema reticuloendotelial (SRE) (OUATTARA *et al.*, 2018). Durante 4 a 25 dias, os parasitos transitam do estágio de amastigota para a sua forma ativamente móvel do parasito e flagelada, a forma promastigota. Em seguida, formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária simples no intestino médio do vetor infectado, migram para o intestino anterior e partes do aparelho bucal do vetor infectado. Os parasitos podem ser posteriormente introduzidos em novos hospedeiros, cujos flebotomíneos fêmeas se alimentam por repastos sanguíneos, concluindo-se o ciclo de transmissão. As formas promastigotas provenientes da probóscide do vetor e transmitidas ao hospedeiro são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear, macrófagos e neutrófilos, e se transformam na forma amastigota, reproduzindo-se de forma assexuada e contínua até que haja ruptura (RIBEIRO *et al.*, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2016) (Figura 2). A proliferação dos parasitos em sua forma amastigota nos macrófagos, presentes no baço e fígado, pode evidenciar sinais clínicos característicos de esplenomegalia e hepatomegalia (MICHELIN *et al.*, 2018; READY, 2014).

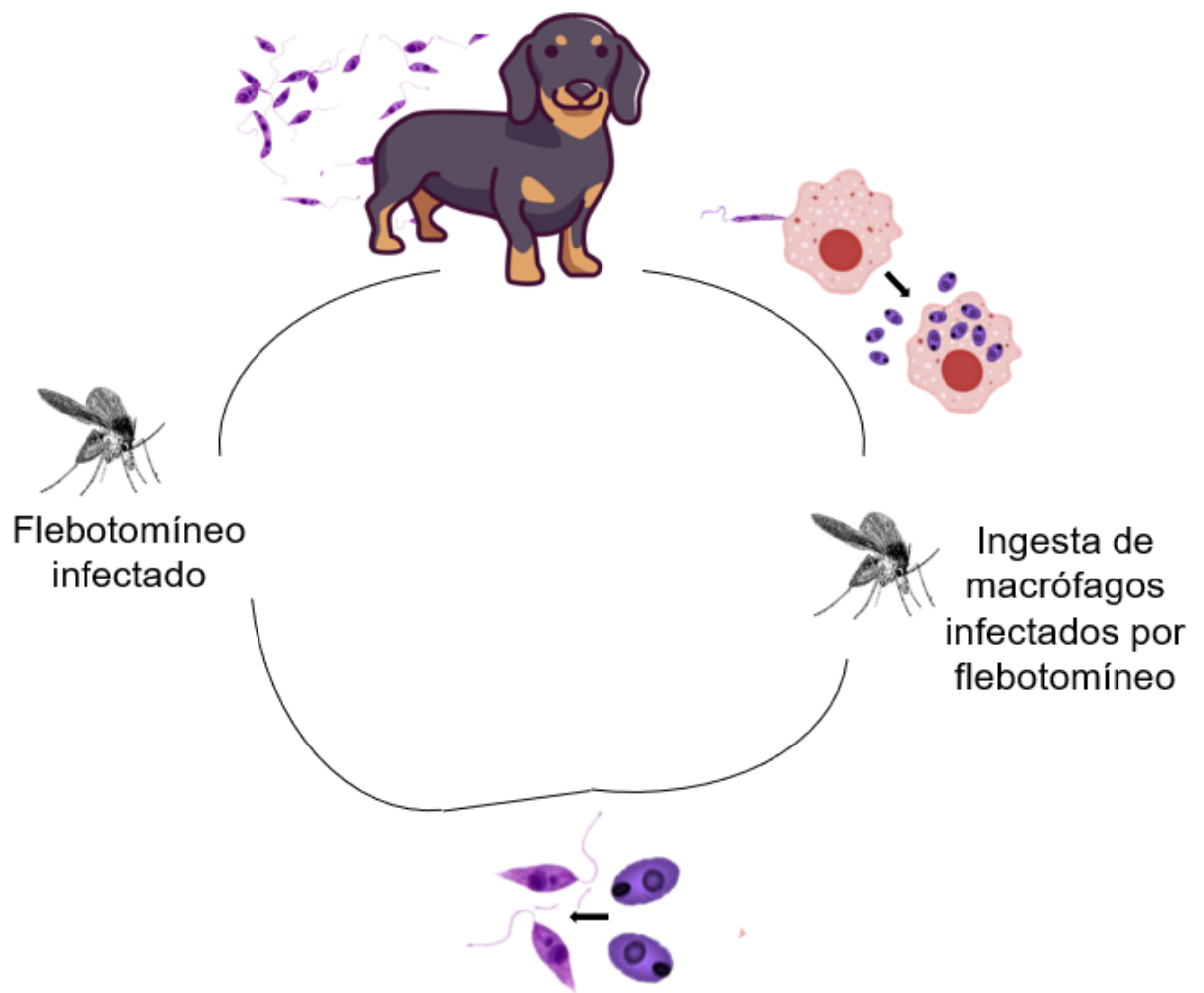


Figura 2: Ciclo biológico de *L. infantum*.

O período de incubação de *L. infantum* varia de 1 mês a 4 anos (DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018; MICHELIN *et al.*, 2018). A evolução da doença depende do estado nutricional e imunológico, idade e raça do animal, além da virulência do parasito, resultando em diversas formas clínicas (MORENO, 2019). O espectro patológico da doença é variado, desde um alto número de parasitos e poucos ou nenhum sinal clínico, até nenhuma detecção de parasitos em cães com lesões significativas e sintomatologia grave (ALVAR *et al.*, 2004). Em 1988, Mancianti e colaboradores propuseram distintas classificações para a LVC, de acordo com a severidade dos sintomas clínicos: 1) cães assintomáticos, sem sinais clínicos (CA); 2) cães oligossintomáticos (CO), que apresentam até três sinais clínicos sugestivos; e 3) cães sintomáticos (CS), que apresentam mais de três sinais clínicos característicos da doença (MANCIANTI *et al.*, 1988). Vale ressaltar que cães assintomáticos podem

apresentar taxas elevadas de carga parasitária, portanto, nem sempre os sinais clínicos representam a carga parasitária real (MICHELIN *et al.*, 2018). Dentre os sinais e sintomas clínicos da LV em cães podemos citar: perda de apetite, perda de peso (emagrecimento), perda de pelo (alopecia), dermatites, lesões na pele (focinho e ponta da orelha), opacificação da córnea, onicogribose e apatia (MANCIANTI *et al.*, 1988; REIS *et al.*, 2009).

2.2 Resposta imune na leishmaniose visceral canina

Após a picada do flebotomíneo fêmea, os parasitos propagam-se a diversos tecidos e órgãos, elevando a carga parasitária e capacidade de infecção do hospedeiro ao vetor; além de ocorrer reações inflamatórias proliferativas que ocasionam infiltração celular com consequente desequilíbrio funcional dos órgãos afetados. Há ainda uma estimulação policlonal de células B, com expressão de imunoglobulinas (ALVAR *et al.*, 2004).

A evolução da LVC e sua patogênese estão correlacionadas com alterações imunológicas envolvendo células T (ALVAR *et al.*, 2004; BARBIÉRI, 2006). Células T CD4⁺ atuam na prevenção do crescimento de *L. infantum* e no progresso da doença. Essas células são produtoras de interferon-gama IFN- γ , responsável pela ativação de macrófagos para células efetoras (TOEPP; PETERSEN, 2020). Cães naturalmente infectados com *L. infantum* possuem uma porcentagem menor de linfócitos T (LT) CD4⁺ no sangue periférico, se comparado à cães saudáveis (ALVAR *et al.*, 2004). Pode-se observar uma redução das populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, com posterior restauração após tratamento medicamentoso com Glucantime® (BARBIÉRI, 2006; BOURDOISEAU *et al.*, 1997). A literatura também descreve, para animais sintomáticos, ausência de hipersensibilidade do tipo retardado aos antígenos de *Leishmania*, ausência de IFN- γ e IL-2 por células mononucleares do sangue periférico *in vitro*, e alta porcentagem de anticorpos anti-*Leishmania* que não são imunoprotetores (BARBIÉRI, 2006; REIS *et al.*, 2009).

Cães resistentes ao desenvolvimento de LVC apresentam imunidade protetora mediada por respostas de linfócitos T CD4⁺ com ativação de células Th1 produtoras de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α) (BARBIÉRI, 2006; SUNDAR; SINGH, 2018). A resposta imune protetora de cães infectados com *L. infantum* envolve, portanto, a ativação de macrófagos por IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela fagocitose de amastigotas, reparo e cicatrização tecidual. Os macrófagos tornam células fagocíticas e linfócitos citotóxicos mais eficientes. Os linfócitos T CD8⁺ atuam com um mecanismo efetor adicional na resistência a LVC (BARBIÉRI, 2006; ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004).

2.3 Detecção e diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Alguns cães assintomáticos conseguem cura espontânea, ao passo que outros podem apresentar evolução severa e doença grave, indo à óbito se não tratados de forma adequada. Uma vez que a zoonose possui estado clínico variável e inespecífico, o diagnóstico clínico é complexo (MANCIANTI *et al.*, 1988). A adoção de técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares para diagnóstico torna-se imprescindível para melhor prognóstico, evitar a transmissão da doença e eutanásia, levando em consideração os seus benefícios e limitações (RIBEIRO *et al.*, 2018).

O diagnóstico parasitológico baseia-se, geralmente, na avaliação de amastigotas presentes na medula óssea (MO), linfonodos e baço, bem como fígado e pele. Técnicas citológicas e histopatológicas são realizadas através de biópsia da pele com posterior preparação de lâminas com esfregaços corados por métodos Giemsa ou Panóptico. A técnica de PCR/qPCR realiza a extração de ácido nucleico, amplificação em termociclador e análises baseadas em gel para demonstrar a expressão gênica específica. Possui alta sensibilidade e especificidade, que possibilita a sua execução em diversas amostras biológicas. Em relação às técnicas sorológicas com detecção de anticorpos específicos contra *Leishmania sp.*, encontram-se disponíveis o teste de anticorpos de imunofluorescência (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (RIBEIRO *et al.*, 2018). O PVCLV preconiza para o diagnóstico da LVC no Brasil a realização dos testes sorológicos: EIE® (ensaio imunoenzimático) e o teste rápido DPP® (*dual fase plataforma*), ambos produzidos pela Biomanguinhos.

2.4 Estratégias de controle e tratamento quimioterápico na leishmaniose visceral canina

As atuais medidas de controle aplicadas, no Brasil, baseiam-se no diagnóstico precoce, utilização de inseticidas ou coleiras em cães impregnadas com inseticidas, medidas sanitárias, estratégias de redução de vetores e recomendação da eliminação do reservatório canino (BRASIL, 2014; TRAVI *et al.*, 2018). Apesar de a eutanásia canina ser recomendada à animais soropositivos (BRASIL, 2014), tal prática gera controvérsias, pois não influencia na prevalência da zoonose (MORENO, 2019). A eliminação do cão, por si só, não é uma estratégia de controle eficaz em áreas de alta transmissão. Ademais, o uso de testes diagnósticos de baixa especificidade podem conduzir à prática de eutanásia indiscriminada e incorreta, reduzindo sua adesão por parte da população (COSTA *et al.*, 2013, 2020).

De forma isolada, tais medidas de controle não são totalmente efetivas para a redução de incidência da doença. Assim, sendo o PVCLV/MS determinou a necessidade de reavaliar as medidas a serem propostas. Desde então, há um maior enfoque na definição e vigilância em áreas de transmissão e risco e também em áreas sem ocorrência de casos caninos da doença (BRASIL, 2014).

A quimioterapia para a LVC não faz parte do PVCLV, portanto, a quimioterapia canina não é recomendada pelo MS ou pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como medida de controle da doença. Apesar disso, no Brasil, partindo da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 – MAPA/MS, desde 2016 está liberado para utilização em clínicas veterinárias o quimioterápico Milteforan™ (Virbac) para o tratamento da LVC (MAPA, 2016). A maioria dos fármacos empregados para o tratamento da LVH quando são empregados para o tratamento da LVC podem melhorar significativamente os sinais clínicos de cães infectados, entretanto, eles permanecem sendo fonte de infecção para flebotomíneos, as recidivas são frequentes e os parasitos não são completamente eliminados, sendo necessário o uso continuado dos medicamentos, que na maioria das vezes são muito caros (REIS *et al.*, 2010). Cabe ressaltar, portanto, que o tratamento de cães soropositivos não se trata de uma medida de controle eficaz da doença (MAPA, 2016; MORENO, 2019). Até 2013, as opções de terapia medicamentosa da leishmaniose humana incluíam antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B e miltefosina (JAIN; JAIN, 2013).

O tratamento da LVC enfrenta desafios na escolha de fármacos que: 1) não sejam utilizados no tratamento da leishmaniose visceral humana (LVH); 2) não induzam efeitos adversos; 3) mantenham a redução da carga parasitária; 4) interfiram no ciclo de vida dos vetores; e 5) impeçam a transmissibilidade de *L. infantum*. Desse modo, é importante avaliar demais alternativas terapêuticas, como a utilização de imunomoduladores e de vacinas (GONÇALVES *et al.*, 2019), na tentativa de aprimorar a eficácia do tratamento de LVC. Se comparado à quimioterapia, a utilização de vacinas anti-LVC torna-se vantajosa, uma vez que induzem efeitos duradouros e podem ser administradas tanto de forma profilática, quanto terapêutica (ABDELLAHI *et al.*, 2022). A vacinação (ou imunomodulação) trata-se de uma medida preventiva do desenvolvimento da doença (TRAVI *et al.*, 2018).

2.5 Ferramentas para avaliação da imunogenicidade e eficácia vacinal

Nos ensaios clínicos vacinais faz-se necessário a avaliação do parasitismo tecidual e de parâmetros imunológicos para conhecimento da imunogenicidade e eficácia de potenciais candidatos vacinais contra a LVC. Estudos que avaliam o perfil fenotípico de cães infectados com *L. infantum* ajudam a estabelecer biomarcadores importantes para a determinação da imunogenicidade e eficácia das vacinas. Neste sentido, a avaliação de biomarcadores na evolução clínica da infecção associados a perfis de resistência/suscetibilidade norteia o desenvolvimento de novas vacinas, como a LBSap, para o controle da LVC (REIS *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diferentes estudos que norteiam o desenvolvimento e teste de imunobiológicos contra a LVC, através da identificação de biomarcadores de resistência e susceptibilidade. A presença de IgG1 associada à menor frequência de intensidade parasitária nos tecidos (REIS *et al.*, 2006a); a elevação de linfócitos T circulantes totais e de suas subpopulações no sangue periférico (REIS *et al.*, 2006b); a elevação de esplenócitos T totais e de suas subpopulações (REIS *et al.*, 2009a; SOARES, 2014), ausência de alterações histopatológicas; carga parasitária reduzida (GIUNCHETTI *et al.*, 2006, 2008b, 2008c; REIS *et al.*, 2009b); e a elevação da produção de citocinas configuram-se como biomarcadores de resistência na patogênese da infecção canina pelo parasito de *L. infantum* (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2011, 2012; PINELLI *et al.*, 1995).

A avaliação de hipersensibilidade tardia *in vivo*, padrões imunofenotípicos *ex vivo* no sangue periférico (células T CD5⁺, células B CD21⁺, subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺) e perfis de IgG anti-*Leishmania* no soro são exemplos de biomarcadores mais estudados no modelo canino (REIS *et al.*, 2010).

O primeiro biomarcador para investigação da resposta imune celular em cães vacinados trata-se da proliferação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Uma resposta linfoproliferativa *in vitro* positiva representa um forte biomarcador de imunogenicidade celular e demonstra o reconhecimento específico dos antígenos vacinais pelos linfócitos caninos após o protocolo vacinal (REIS *et al.*, 2010).

A avaliação de hipersensibilidade tardia, que demonstrará uma resposta específica dos linfócitos T nos animais avaliados após 48 horas da inoculação de antígenos intradérmicos, é também uma opção para demonstrar uma resposta imune celular gerada nos cães expostos a antígenos do parasito. Os antígenos empregados podem ser específicos de imunizações, ou até mesmo, antígenos totais de *Leishmania* para conferência do perfil de resposta dos animais após o desafio experimental ou infecção naturalmente. Entretanto, são necessárias mais estudos acerca da metodologia bem como da seleção dos melhores antígenos para serem utilizados (REIS *et al.*, 2009a).

Com a intenção de se aprimorar a análise da resposta imune celular na leishmaniose visceral canina, diversas abordagens imunológicas têm sido estudadas. A imunofenotipagem de leucócitos (*ex vivo*) ou padrões imunofenotípicos específicos de CMSP (citometria de fluxo *in vitro*) caracterizam melhor a imunogenicidade das vacinas anti-LVC (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; GIUNCHETTI *et al.*, 2007, 2008a, 2008d). A citometria de fluxo é capaz de medir e identificar populações e subpopulações celulares como potenciais biomarcadores, através da análise de marcadores fenotípicos com combinações de respostas funcionais. Utiliza-se um padrão de produção de citocinas por um painel de anticorpos monoclonais (SOARES, 2014). Estudos que utilizaram tal abordagem observaram uma elevação de células T (CD5⁺, CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e células B CD21⁺ que, em conjunto com a habilidade de apoptose por parte dos macrófagos, são considerados marcadores de respostas imunes protetoras (ARAÚJO *et al.*, 2008; BORJA-CABRERA *et al.*, 2008;

GIUNCHETTI *et al.*, 2007). Os macrófagos são as células-alvo dos parasitos e podem desencadear uma resposta imune adquirida (GIUNCHETTI *et al.*, 2019)..

A avaliação das citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10) em sobrenadantes por ELISA ou da expressão de mRNA em CMSP estimulados por *Leishmania* por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) também têm sido utilizadas para identificação de padrões imunológicos em cães vacinas antes e após o desafio experimental. A técnica de qPCR tem substituído, aos poucos, a PCR convencional, uma vez que possui alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade. A citocina IFN- γ possui destaque como biomarcador de imunogenicidade e proteção contra o parasito (LEMESRE *et al.*, 2005; RAFATI *et al.*, 2005). A identificação do perfil de citocinas relacionado à resistência/suscetibilidade de cães infectados é importante no acompanhamento clínico do desenvolvimento da doença (GIUNCHETTI *et al.*, 2019).

Outro biomarcador de imunidade empregado nos ensaios vacinais na LVC consiste na análise da produção de NO no soro ou sobrenadante de culturas *in vitro* de CMSP, ou até mesmo em tecidos-alvo do parasito. Vários estudos na literatura têm demonstrado que cães infectados, mas com a forma clínica assintomática, apresentam níveis elevados de NO quando comparados com cães sintomáticos (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; HOLZMULLER *et al.*, 2005; VIEIRA, 2018). Assim, o NO demonstra ser um bom biomarcador de resistência contra o parasito de *Leishmania*, sendo assim empregado como ferramenta metodológica para avaliação de potenciais imunobiológicos nos ensaios clínicos vacinais de fase I e II (REIS *et al.*, 2009, 2010).

A potencial ou eficácia vacinal contra *Leishmania* já foi avaliada por abordagens distintas, como o isolamento de parasitos nos tecidos (medula óssea, fígado, linfonodo e baço) e PCR (sangue, medula óssea e linfonodo). Devem ser consideradas ainda as metodologias de imuno-histoquímica de *Leishmania* e qPCR em diferentes tecidos (medula óssea, pele, baço, fígado e linfonodo) (NOGUEIRA *et al.*, 2005; PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; REIS *et al.*, 2010).

Dentro as metodologias empregadas para a avaliação da potência vacinal em ensaios clínicos vacinais de fase I e II temos a técnica de cocultivo celular. A técnica de cocultivo contribui para a análise da resposta imune adaptativa em cães, e pode ser incorporada em estudos de vacina contra a LVC que visam analisar o potencial microbicida induzido por células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ específicas (VIANA *et al.*, 2013).

É uma alternativa viável às técnicas mais invasivas de estudo da resposta imune no cão, como aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, nos quais geralmente apresentam riscos, necessitam de procedimentos controlados, assistência profissional qualificada e podem interferir na resposta do hospedeiro durante estudos de acompanhamento (VIANA *et al.*, 2015). A abordagem é útil na avaliação da produção de IFN- γ , IL-4 e NO por linfócitos T CD4⁺ e macrófagos de cães resistentes e susceptíveis, indicando se um candidato vacinal é ou não capaz de estimular uma resposta imune associada com a resistência à infecção por *L. infantum* (VIANA, 2012).

Os macrófagos são responsáveis pela apresentação de antígenos e estabelecimento de uma resposta imune efetiva contra o parasito. A capacidade microbida de macrófagos infectados por *Leishmania* cocultivados com células T CD4⁺ ou CD8⁺ específicas pode ser avaliada em modelo experimental canino durante testes de vacinas ou estratégias de tratamento contra a LVC (VIANA *et al.*, 2015).

Os primeiros ensaios *in vitro* com cocultivo de células mononucleares de cães experimentalmente infectados com *L. infantum* foram realizados na década de 90, quando demonstraram a ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ em macrófagos caninos (PINELLI *et al.*, 1994). Desde então, alguns autores têm avaliado a correlação entre a resposta de células T (CD8⁺ e CD4⁺) com a sintomatologia e lise dos macrófagos de cães infectados. Um estudo observou que a capacidade de apoptose de *Leishmania*, por parte de macrófagos cocultivados com linfócitos autólogos de cães vacinados com LiESAp, é maior do que em macrófagos de cães que receberam placebo. Os resultados mostraram alta produção de IFN- γ e NO em sobrenadante de cultura (HOLZMULLER *et al.*, 2005; LEMESRE *et al.*, 2007). Bordoiseau e colaboradores (2009) mostraram o efeito inibitório sob o potencial infectante de promastigotas e a proliferação de *L. infantum* por cães imunizados. Estes estudos foram pioneiros na avaliação de cocultivo celular associado à inclusão de soro de cães imunizados contra a doença em sistema *in vitro*. Neste sentido, o sistema de cocultivo apresenta potencial para incorporação aos ensaios clínicos vacinais de Fase II, ao passo que pode norteiar elementos da resposta imune na triagem de candidatos vacinais anti-LVC (VIANA, 2012).

2.6 Vacinas para a leishmaniose visceral canina

Após ser constatado que cães naturalmente infectados por *L. infantum* desenvolvem uma resposta imune à LVC, iniciaram-se os estudos de desenvolvimento de vacinas, com indução de proteção imunológica. A proliferação do parasito em cão soropositivo pode ser impedida através da aplicação de vacinas (MORENO, 2019). A imunização efetiva de cães em regiões com alto risco de transmissão poderia reduzir a incidência da LV em humanos, logo, a vacinação consiste em uma boa medida de controle da LVH (ALVAR *et al.*, 2004). Entretanto, faz-se necessário a realização de mais estudos acerca da resposta imune do cão infectado para o controle da zoonose (CARNEIRO, 2016).

O protozoário *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar e modificar mecanismos de morte celular de macrófagos hospedeiros de mamíferos. Induz a produção, através das células T, de IL-4 e outros fatores que levam à evolução da doença e sobrevivência do parasito (ABDELLAHI *et al.*, 2022). Pode desencadear hipersensibilidade do tipo imediata, através de células Th2 expressando IL-4, IL-5 e IL-13; ou hipersensibilidade do tipo retardada, através de células Th1 expressando IFN- γ , IL-12 e/ou TNF- α , ambas mediadas por células T CD4⁺ auxiliares (Th) (MORENO, 2019).

Uma resposta imune efetiva, com linfócitos T CD4⁺ (tipo Th1) e T CD8⁺ ativados por células dendríticas que produzem IFN- γ , IL-12 e/ou TNF- α , é capaz de evitar a proliferação e disseminação do parasito. As citocinas ativam os macrófagos infectados para produzir óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROs), a fim de se eliminar a *Leishmania*. A literatura descreve que o parasito, no entanto, possui mecanismos de indução da expressão de IL-10 imunossupressora, intervém na produção de anticorpos específicos para *Leishmania*, bloqueia clones de células T CD8⁺ específicas do parasito, e é capaz de inibir a apresentação de antígenos dos macrófagos. Neste sentido, o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a LVC pode ser comprometido, devido à complexidade antigênica do patógeno (MORENO, 2019; SCOTT; RILEY, 2014).

Uma vacina com potencial contra a LVC deve induzir, a nível populacional, uma resposta imune pró-inflamatória forte e duradoura mediada por células para: 1) precaver o desenvolvimento de uma infecção inicial; 2) controlar a evolução da

doença; e 3) impedir a transmissão do parasito por cães imunizados, caso sejam infectados (DANTAS-TORRES *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2010). Após a infecção, os candidatos vacinais são avaliados quanto ao seu reconhecimento *in vitro*, por parte dos linfócitos T. Após a vacinação dos animais, a imunogenicidade vacinal pode ser avaliada através da capacidade do imunizante em induzir resposta de células T, células importantes para a confecção de uma resposta imune dita protetora. Em seguida, as vacinas passam por testes de tolerância e segurança e *in vivo*, a fim de se confirmar uma proteção eficaz (REIS *et al.*, 2010).

Ensaio vacinais de Fase I são realizados a fim de se comparar um grupo de indivíduos que receberam o imunobiológico com aqueles tratados com o placebo, avaliando a imunogenicidade e segurança da vacina; ensaios de Fase II avaliam a potência e eficácia vacinal; e os ensaios de Fase III avaliam a eficácia vacinal em regiões endêmicas (SOARES, 2014; WHO, 2010). Há uns anos, a maioria das pesquisas acerca de vacinas anti-LV envolviam estudos de Fase I e II, utilizando camundongos como modelo experimental (REIS *et al.*, 2010). Nos dias atuais, têm sido realizados vários estudos vacinais utilizando o modelo canino. Cães com LVC são considerados bons modelos experimentais para melhor compreender a patogênese da doença humana e canina, uma vez que desenvolvem alteração clínicas, patológicas e imunológicas semelhantes (ALVES *et al.*, 2010).

Devido a importância do desenvolvimento de vacinas potentes e eficazes contra a LVC como medida de controle da doença (OMS, 2010), diferentes grupos de pesquisa têm trabalhado com o desenvolvimento biotecnológico de diversos reportórios antigênicos como potenciais candidatos imunoproliféricos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2020; MORENO, 2019; REIS *et al.*, 2010). Existem atualmente vacinas contendo parasitos de *Leishmania* vivos atenuados ou mortos (primeira geração); proteínas recombinantes do parasito (segunda geração); e utilizando o DNA que codifica proteínas de *Leishmania* (terceira geração) (JAIN; JAIN, 2015; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2017). Além disso, o desenvolvimento de uma vacina utilizando antígenos não salivares de flebotomíneos mostrou-se como uma estratégia promissora de controle dos vetores, uma vez que interfere no seu ciclo de vida e impede a infecção do parasito em flebotomíneos (GIUNCHETTI *et al.*, 2008a).

Três vacinas são aprovadas e disponíveis comercialmente contra a LVC: Canileish (MORENO *et al.*, 2012) e Letifend[®] (CARCELÉN *et al.*, 2009), disponíveis na Europa; e Leish-Tec[®], comercializada no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 2017; REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que as vacinas ainda não foram testadas quanto à eficácia contra a LV humana, e que não há evidências de que a imunização canina reduza, de forma significativa, a infecciosidade de cães vacinados infectados (DANTAS-TORRES *et al.*, 2020). Ademais, as vacinas Canileish e Letifend[®] não possuem aprovação pelo MAPA para serem comercializadas no Brasil.

Parasitas inativados de *Leishmania* constituíram a primeira geração de vacinas contra a LV. Estas vacinas têm apresentado segurança e induzido imunogenicidade e proteção (NOAZIN *et al.*, 2008). O uso de antígenos brutos promoveu resposta imune celular, redução da taxa de infecção (MAYRINK *et al.*, 1996), e desencadeou resposta celular envolvendo linfócitos T CD8⁺ (ARAÚJO *et al.*, 2008). Tais resultados estimularam nosso grupo de pesquisa a se dedicar ao estudo de biomarcadores de resistência/susceptibilidade à infecção por *L. chagasi* em cães, a fim de analisar a imunogenicidade em cães vacinados contra o parasito. Neste sentido, desenvolvemos o imunobiológico LBSap, composto por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina. A vacina revelou potencial imunogênico promissor, uma vez que elevou os níveis de linfócitos T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e B (CD21⁺) circulantes; além de aumentar a atividade de linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos, intensificar a atividade linfoproliferativa e elevar a produção de NO *in vitro* (ROATT *et al.*, 2012; SOARES, 2014). Na esfera da resposta imune humoral, detectaram-se altos níveis de anticorpos IgG total e das subclasses (IgG1 e IgG2) anti-*Leishmania* (GIUNCHETTI, 2007). Considerando o exposto, a LBSap tem apresentado forte imunogenicidade na esfera das respostas celular e humoral (SOARES, 2014). Os resultados de um estudo clínico de fase I e II com a vacina indicaram o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores e biomarcadores relacionados à proteção contra a patogênese. A LBSap pode, portanto, prosseguir para um ensaio clínico randomizado duplo-cego de fase III (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020).

Vários estudos utilizando proteínas de *Leishmania* têm sido realizados, a fim de se combater a limitação da variação do repertório antigênico e assim da resposta imune variável por parte das vacinas de primeira geração (JAIN; JAIN, 2015). Em

2001, foi relatada e licenciada a primeira vacina para a LVC, denominada Leishmune®(Fort Dodge Saúde Animal Ltda). Partindo de antígenos purificados do complexo *Donovani* (fucose-manose ligante) contra LVC, a vacina de segunda geração demonstrou indução de imunidade mediada por células (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; MORENO; ALVAR, 2002). Trata-se de um preparado de glicoproteínas com promastigotas de *L. donovani* para uso humano e canino, que passou por Ensaio de Fase I, II e III (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008). Em estudos vacinais de Fase III, utilizando modelo experimental canino, o antígeno FML revelou 92% a 95% de proteção contra a LVC no grupo vacinado, com 76% de eficácia vacinal (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2000). Foram observadas alterações fenotípicas precoces em neutrófilos e monócitos, estímulo de células T CD8⁺ e indução de resposta pró-inflamatória específica mediada por IFN- γ e NO (ARAÚJO *et al.*, 2011; NICO *et al.*, 2012). Ensaio vacinais de Fase III demonstraram 92% a 95% de proteção contra a LVC no grupo vacinado correspondendo a 76% de eficácia vacinal (ARAÚJO *et al.*, 2011; NICO *et al.*, 2012). Entretanto, a vacina Leishmune® teve sua produção e comercialização interrompidas em 2014, visto que não atendia aos requisitos dos estudos de fase III preconizados pelo MAPA no Brasil (ABDELLAHI *et al.*, 2022).

A vacina Leish-Tec® foi licenciada em 2007 pelo MAPA. É composta pelo antígeno A2, uma proteína recombinante de amastigotas de espécies distintas de *Leishmania*, contendo saponina como adjuvante. Apesar de ser licenciada para profilaxia e recomendada à cães saudáveis, um estudo apresentou-se satisfatório quanto à vacinação em cães tanto com sorologia negativa quanto positiva (FERNANDES *et al.*, 2014). A vacina induziu a elevação de IFN- γ em cães que foram associados à proteção contra o desafio de *L. infantum* (FERNÁNDEZ COTRINA *et al.*, 2018). Foi relatado 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). A eficácia da Leish-Tec® foi de 58,1% (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Visto que 43% dos cães infectados vacinados desenvolveram a doença, Grimaldi e colaboradores concluíram que a vacina se mostrou promissora como vacina profilática, necessitando, porém, da

otimização dos estudos para impactar na prevalência e incidência de infecção canina por *L. infantum* (GRIMALDI *et al.*, 2017).

Em 2014, Fernandes e colaboradores avaliaram a resposta imune humoral, sinais clínicos, parasitismo e infecciosidade parasitária em cães de regiões endêmicas que foram imunizados com Leishmune® e Leish-Tec®. Os autores demonstraram a detecção do parasito por esplenocultura e/ou PCR do baço em 11,1% do grupo Leishmune®, e 8,8% no grupo Leish-Tec®. Não foram observadas diferenças significativas dos aspectos avaliados nos dois grupos de cães (FERNANDES *et al.*, 2014). Em 2016, foi realizado um estudo comparativo no modelo murino quanto aos efeitos dos imunobiológicos LBSap, Leish-Tec® e Leishmune®, sendo demonstrado que a vacina LBSap induziu perfis imunológicos e de eficácia comparáveis aos das vacinas comercialmente disponíveis na época do estudo (DE MENDONÇA *et al.*, 2016).

Uma outra proposição para o repertório antigênico vacinal anti-*Leishmania* são as vacinas com proteínas recombinantes, em que diversos antígenos específicos purificados e combinados com diferentes tipos de adjuvantes vacinais foram testados por diferentes grupos de pesquisa nos últimos anos (MORENO, 2019; REIS *et al.*, 2010). Um dos antígenos amplamente estudados em diferentes modelos experimentais como potencial vacina contra a LV é a *kinetoplastid membrane protein 11* (KMP-11), uma proteína de membrana de cinetoplastídeos associada ao lipofosfoliglicano (LPG), que é expressa nos estágios amastigota e promastigota da *Leishmania*. Vários estudos têm demonstrado a imunogenicidade (BERBERICH; REQUENA; ALONSO, 1997) e capacidade protetora dessa proteína (CARRILLO *et al.*, 2008). Trata-se de um candidato vacinal promissor contra a leishmaniose. Foi relatado indução da produção de IFN- γ (JAIN; JAIN, 2013; STEBECK *et al.*, 1995), reconhecimento dos epítomos B e T por hospedeiros de *L. infantum* e aumento da expressão de mRNA de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após estímulo com r-KMP-11 (CARRILLO *et al.*, 2008). KMP-11 demonstra antigenicidade para células T em modelo murino e humano, com estímulo de resposta imune inata e adaptativa (DE MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015). Até o presente momento, não há estudos que demonstrem a segurança e imunogenicidade desta formulação em modelo canino (SOARES, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A LV é a forma clínica mais severa das leishmanioses que, quando não tratada, pode levar à óbito. A LVC encontra-se em processo de expansão em diferentes regiões do Brasil e do mundo, posicionando-se como um grave problema de saúde pública. No Brasil, o PVCLV/MS descreve que as atuais medidas de controle se baseiam no diagnóstico precoce, tratamento dos casos, controle de vetores e na eliminação do reservatório canino. De forma isolada, tais medidas de controle não são totalmente efetivas para a redução de incidência da doença. Além disso, até o momento não existem alternativas terapêuticas capazes de conduzir a cura parasitológica duradoura em cães infectados e, conseqüentemente, reverter o papel de reservatório no ciclo de transmissão. Neste contexto, a imunoprofilaxia apresenta-se como principal alternativa a ser incluída nos programas de controle da LV. Embora o Brasil possua uma vacina comercial disponível (Leish-Tec[®]), o MS não a inclui no PVCLV. É de fundamental importância a incorporação de novas estratégias metodológicas em ensaios de fase I e II para investigação da inocuidade, imunogenicidade e eficácia vacinal.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de diversas abordagens aplicadas a testes de vacinas, o que nos permitiu criar um núcleo de excelência reconhecido (PRONEX/CNPq/FAPEMIG & DECIT/MS) que estabeleceu um centro de referência para testes de vacinas contra a LVC. Dentre as propostas, o presente estudo avalia a imunogenicidade e potência dos protótipos vacinais LBSap e KMP-11, e das vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®], através do emprego do sistema de cocultivo celular em um ensaio clínico vacinal de fase I e II comparativo em cães, após protocolo de imunização. O sistema de cocultivo celular empregado neste estudo demonstra ser uma nova e acurada ferramenta, que pode ser útil em laboratórios de pesquisa como parâmetro de avaliação da capacidade das células imunes caninas em controlar a infecção *in vitro* por *L. infantum* como um biomarcador para identificar mecanismos de imunogenicidade e potência vacinal. Dessa forma, através da empregabilidade do sistema de cocultivo, acreditamos que será possível o encaminhamento de forma dinâmica de potenciais vacinas para prosseguir com testes de Fase III.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a imunogenicidade e potência vacinal em cães imunizados com os imunobiológicos LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP-11 contra leishmaniose visceral canina empregando um sistema de cocultivo celular.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar no sistema de cocultivo a taxa e a carga de infecção de macrófagos pelo parasito de *L. infantum* cultivados sozinhos ou cocultivados com linfócitos T (CD4⁺) ou (CD8⁺) ou (CD4⁺ e CD8⁺) autólogos de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos, através:

- Da taxa e da carga de infecção de macrófagos, diferenciados de monócitos do sangue periférico, pelo parasito *L.infantum*;
- Da taxa e da carga de infecção de macrófagos, diferenciados de monócitos do sangue periférico, pelo parasito *L.infantum* cocultivados com linfócitos T (CD4⁺) autólogos de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos;
- Da taxa e da carga de infecção de macrófagos, diferenciados de monócitos do sangue periférico, pelo parasito *L.infantum* cocultivados com linfócitos T (CD8⁺) autólogos de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos;
- Da taxa e da carga de infecção de macrófagos, diferenciados de monócitos do sangue periférico, pelo parasito *L.infantum* cocultivados com linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) autólogos de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos.

5 METODOLOGIA

5.1 Grupos experimentais

Um total de 35 cães sem raça definida foram distribuídos aleatoriamente em 5 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.

5.2 Delineamento experimental e abordagens investigativas

O ensaio vacinal de Fase I e II proposto neste projeto apresenta abordagens investigativas que envolvem diversos parâmetros de avaliação em um sistema *in vitro* de cocultivo celular. As amostras de sangue dos 35 cães foram coletadas 15 dias após o protocolo completo de imunização para análise *in vitro* da imunogenicidade vacinal para o sistema de cocultivo celular (Protocolo CEUA nº 2010/71 – Anexo 1). A coleta do sangue foi realizada 15 dias após a terceira dose vacinal (barra azul) (Diagrama 1). Após a coleta de sangue, as CMSP foram obtidas, cultivadas, diferenciadas (monócitos), isoladas (linfócitos CD4⁺ e CD8⁺) e colocadas em cultivo com o parasito

de *L. infantum* para compor o sistema de cocultivo proposto. Foram preparadas lamínulas contendo essas células cocultivadas, que foram posteriormente coradas e armazenadas para a realização das contagens em microscópio óptico.

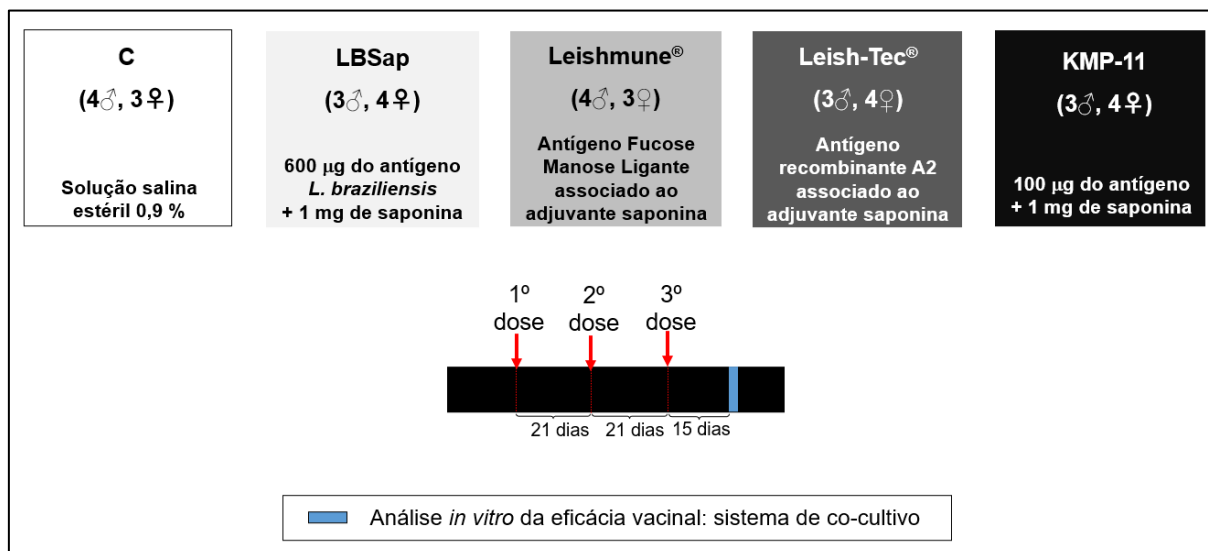


Figura 3: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação da imunogenicidade e potência através do sistema de cocultivo em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C); vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da ordem dos Kinetoplastida de 11 kDa, de *Leishmania infantum*, associado à saponina).

5.3 Sistema de cocultivo celular

5.3.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Inicialmente, as seringas heparinizadas contendo 40 mL de sangue coletados foram aplicadas lentamente sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15 mL de Ficoll-Hypaque 1.119 e 15 mL de Ficoll-hypaque 1.077, em dois tubos de 50 mL de polipropileno, os quais foram centrifugados a 450 x g por 70 minutos. Após este procedimento, o anel celular contendo as CMSP foi recolhido e transferido para outro tubo de 50 mL de polipropileno. À suspensão de CMSP, foi adicionado 30mL de PBS + EDTA, seguido de centrifugação a 450 x g por 10 minutos a 4 °C. Este processo de lavagem foi repetido e, ao final, as células foram ressuspensas em 2 mL de RPMI 1640. Para a contagem, foi utilizada a câmara de Neubauer. Assim, o volume final foi

ajustado para conter 1×10^6 células/mL. Além disso, separou-se uma alíquota de 50 μ l de cada amostra para obtenção da percentagem de monócitos por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickinson®). As CMSP foram então transferidas para garrafas de cultura de 400 mL, que permaneceram incubadas durante 24h em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Finda a incubação, os monócitos encontravam-se aderidos ao fundo da garrafa e os linfócitos permaneceram no sobrenadante. Sendo assim, o meio de cultura contendo os linfócitos, foi transferido para outra garrafa de cultura, separando os dois tipos de CMSP.

5.3.2 Condições de cultivo para derivação de monócitos circulantes em macrófagos

Após a separação dos linfócitos presentes no sobrenadante, foi adicionada à garrafa contendo os monócitos a mesma quantidade de RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB), suplementado com 20% de sobrenadante de fibroblastos da linhagem L929, contendo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Ambas as garrafas de cultura foram incubadas por mais 4 dias, nas mesmas condições anteriores. Todo esse procedimento foi realizado de acordo com VIANA e colaboradores (2015). Após os 5 dias de cultivo, o sobrenadante das garrafas de cultura contendo os macrófagos foi descartado, sendo adicionado RPMI 1640 com 10 % de SFB. Posteriormente, as células foram raspadas gentilmente com a ajuda de um *cell scraper* e o sobrenadante transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL. Após o processo de centrifugação a 515 x g, 10 minutos, 4°C, o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de RPMI com 10 % de SFB, uma alíquota separada para contagem das células na câmara de Neubauer e posteriormente foi realizado o ajuste para 1×10^6 macrófagos/mL.

5.3.3 Purificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Após 5 dias de cultivo, as células linfocitárias foram coletadas e transferidas para tubos de 50 mL de polipropileno, que foram centrifugados a 515 x g, 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de RPMI 1640 com 10% de SFB, para contagem na câmara de Neubauer e marcação com 8 μ L de

anticorpo anti-CD8⁺FITC, seguida de incubação ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação, foi adicionado 10 mL de PBS-W + EDTA, realizada a centrifugação a 515 x g, 10 minutos, 4 °C e ressuspensão em PBS-W + EDTA na proporção de 90 µl por cada 1x10⁷ células. Posteriormente, 10 uL das *beads* anti-FITC (BD-Biosciences®) foram adicionadas, com incubação por 20 minutos, centrifugação a 450 x g, 70 minutos, 4 °C e ressuspensão em 500 µL de PBS-W + EDTA.

Em seguida, a suspensão celular foi adicionada à coluna de MACS (Miltenyi Biotec®) e após todo o líquido ser absorvido pela coluna, foi adicionado 15 mL de PBS-W+EDTA, deixando gotejar todo o volume para um tubo de polipropileno de 50 mL (Depletado 1). De forma a liberar os linfócitos T CD8⁺ retidos, a coluna foi retirada do suporte e lavada por 3 vezes com 5 mL de solução tampão (PBS-W + EDTA), para um tubo de polipropileno de 50 mL, pressionando vigorosamente o êmbolo. O tubo contendo os linfócitos T CD8⁺ foi centrifugado a 515 x g, 10 minutos, 4 °C, o sobrenadante descartado e ressuspendido para 1 mL, sendo posteriormente retirada uma alíquota para leitura no citômetro de fluxo. Finalmente, foi efetuada a contagem em câmara de Neubauer, de forma a ressuspender os linfócitos T CD8⁺ na concentração de 2x10⁵/mL. O depletado 1 foi centrifugado 515 x g, por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 8 uL de anti-CD4PE, seguido de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 mL de PBS-W + EDTA, realizada a centrifugação a 515 x g, 10 minutos, 4°C e ressuspensão em PBS-W + EDTA na proporção de 90 µl por cada 1x10⁷ células. Posteriormente, 10 µL das *beads* anti-PE (BD-Biosciences®) foram adicionadas, com incubação por 20 minutos, centrifugação a 515 x g, 70 minutos, 4 °C e ressuspensão em 500 uL de PBS-W + EDTA. Tal como descrito anteriormente para os linfócitos T CD8⁺, a suspensão celular foi adicionada à coluna de MACS, seguida de 15 mL de PBS-W + EDTA e, após passagem de todo o líquido pela coluna, os linfócitos T CD4⁺ foram libertados, lavando por 3 vezes com 15 mL solução tampão, pressionando de forma vigorosa o êmbolo. Este tubo foi centrifugado a 515 x g, 10 minutos, 4 °C, o sobrenadante descartado e ressuspendido em 1 mL para contagem dos linfócitos T CD4⁺, que foram ressuspendidos na concentração de 2x10⁵/mL, sendo retirada uma alíquota para aferição da pureza por citometria de fluxo.

5.3.4. Preparo de promastigotas de *L. infantum* e parâmetros de avaliação

Além dos linfócitos e macrófagos foi necessário preparar as promastigotas de *L. infantum* OP46 para o cocultivo. Para isto, 2 mL da cultura de promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio NNN/LIT foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foi adicionado 8 mL de RPMI com 10 % de SFB. O tubo foi centrifugado por 550 x g, 10 minutos, 24 °C, o sobrenadante foi descartado, as promastigotas ressuspensas em 1 mL de RPMI com 10 % SFB e contadas em câmara de Neubauer. Seguidamente, foi ajustada a concentração de promastigotas para 1×10^7 parasitos/mL.

No final de todo o processo de obtenção dos macrófagos, separação das subpopulações de linfócitos em colunas magnéticas e crescimento de promastigotas de *L. infantum* OP46, 1×10^5 macrófagos foram transferidos para cada um dos *wells* da placa de 24 poços (triplicata), juntamente com promastigotas de *L. infantum* na proporção de 10 parasitos por 1 macrófago, por um período de infecção de 3 horas. Findo este tempo, o sobrenadante com as promastigotas de *L. infantum*, que não internalizaram nos macrófagos, foi removido e adicionado 1 mL de RPMI com 10% SFB. Em seguida, macrófagos infectados com os parasitos foram cultivados sozinhos ou na presença de linfócitos T CD4⁺ ou linfócitos T CD8⁺, ou ambas as subpopulações de linfócitos T (na proporção de 1 linfócito para 2 macrófagos). Todas as placas contendo as células cocultivadas dos diferentes grupos de cães vacinados foram incubadas durante 72 h em estufa de CO₂ 5 % a 37 °C.

Após o tempo de incubação, as lamínulas contendo as células previamente acondicionadas ao fundo dos *wells* em cada placa, foram removidas, coradas com o corante Panótico rápido, fixadas com Entellan em lâminas e identificadas. Para cada uma das diferentes variáveis/condições e proporções celulares propostas no sistema de cocultivo, foram feitas lamínulas em triplicata. Foi realizada e avaliada a contagem por microscopia óptica da frequência/porcentagem média de macrófagos infectados e o número médio de amastigotas de *L. infantum* por macrófagos infectados (carga parasitária nos macrófagos) (Quadro 1).

Condições de cocultivo	Avaliações
$M\phi + L. infantum$	<ul style="list-style-type: none"> Frequência (porcentagem média) de macrófagos infectados; Número médio de amastigotas de <i>L. infantum</i> por macrófagos infectados.
$M\phi + CD4^+ + L. infantum$	
$M\phi + CD8^+ + L. infantum$	
$M\phi + CD4^+ + CD8^+ + L. infantum$	

Quadro 1: Tipos de avaliações e condições no sistema de cocultivo *in vitro* de macrófagos ($M\phi$) infectados derivados de monócitos circulantes e linfócitos T autólogos.

5.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* 6.0 (Prism Software, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi empregado para avaliar a distribuição amostral dos dados. As análises das diferentes avaliações entre os grupos experimentais do cocultivo foram realizadas com auxílio do Teste ANOVA. Em todos os casos foram consideradas significativas as diferenças com valores de p igual ou menor 0,05 e todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise *in vitro* da imunogenicidade e da potência vacinal no sistema de cocultivo

A progressão da infecção por *Leishmania* em cães correlaciona-se à resposta imune do hospedeiro e à persistência e proliferação do parasito (MORENO; ALVAR, 2002). Há diversos estudos acerca do conhecimento de mecanismos imunoprotetores induzidos (imunogenicidade) por vacinas contra a LVC (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2011; BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2014; GIUNCHETTI *et al.*, 2007). Trabalhos que avaliam a resposta imune na terapia, em ensaios vacinais ou na história natural da doença geralmente baseiam-se na investigação de leucócitos circulantes ou diretamente nos órgãos afetados (GIUNCHETTI *et al.*, 2008d; REIS *et al.*, 2009b, 2010).

O perfil da resposta imune celular em cães pode ser avaliado através da imunofenotipagem de leucócitos circulantes (*ex vivo*) ou por padrões imunofenotípicos específicos de antígenos de CMSP (*in vitro*) através da citometria de fluxo (ARAÚJO *et al.*, 2008, 2009; GIUNCHETTI, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008c, 2008b). A abordagem de avaliação de leucócitos circulantes geralmente necessita de estímulos, como o antígeno solúvel de *Leishmania* (ASLi), que não são totalmente representativos do curso natural da infecção (VIEIRA, 2018). Um estudo de 2010 demonstrou que o estímulo de CMSP com parasitos e promastigotas vivas induziram uma produção maior de citocinas e uma taxa proliferativa menor, se comparado ao estímulo com o parasito morto, em culturas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (NATEGHI ROSTAMI *et al.*, 2010). Um estudo de imunização com a vacina *L. donovani* geneticamente modificada (LdCen -/-) resultou em uma maior produção de citocinas e de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, além de maior resposta linfoproliferativa e redução da carga parasitária em cães desafiados experimentalmente (FIUZA *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2016).

Estudos de imunogenicidade utilizando o modelo experimental canino antes e após o desafio experimental com promastigotas *L. infantum* contribuem para a identificação de biomarcadores determinantes da imunogenicidade de vacinas anti-LVC, além estabelecer diferentes abordagens para avaliar a eficácia vacinal

(FERNANDES *et al.*, 2008; LEMESRE *et al.*, 2005; MAYRINK *et al.*, 1996; RAFATI *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2010; ROATT *et al.*, 2012). O primeiro biomarcador utilizado para se investigar a resposta imune celular em cães vacinados consistiu em uma técnica *in vitro* com a proliferação de CMSP (GIUNCHETTI, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008b, 2008c; MAYRINK *et al.*, 1996; RAFATI *et al.*, 2005). A eficácia vacinal pode estar relacionada à uma resposta linfoproliferativa positiva *in vitro*, destacando-se como um potencial biomarcador de imunogenicidade (REIS *et al.*, 2010). O presente estudo apresenta parâmetros imunológicos que, partindo de um sistema de cocultivo celular, podem ser utilizados como biomarcadores de resistência e susceptibilidade para futuras pesquisas.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios de macrófagos de mamíferos (LEMESRE *et al.*, 2005). Os macrófagos possuem plena capacidade de apresentação de antígenos e estabelecimento de uma resposta efetiva contra o parasito (PINELLI *et al.*, 1999). Sua capacidade em causar a morte de *Leishmania* consiste em outro importante biomarcador de avaliação da resposta imune induzida pela infecção (REIS *et al.*, 2010). Nossa pesquisa utiliza o método de cocultivo, descrito em diversos estudos vacinais com a finalidade de analisar o potencial microbicida induzido por células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ antígeno-específicas cocultivadas com macrófagos de cães infectados por *Leishmania* (VIANA *et al.*, 2013).

De forma a verificar as variações nas taxas de parasitismo de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico em cães imunizados com os imunobiológicos LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP-11, foi determinada a variação do percentual de infecção e da intensidade da infecção (carga parasitária) em diferentes condições de cocultivo, conforme descritas no Quadro 1. Os resultados consistem numa análise *in vitro* da imunogenicidade e potência vacinal e agregam diferentes abordagens.

6.1.1 Avaliação de macrófagos de cães vacinados infectados por *L. infantum*, na ausência de linfócitos T

A figura 3 representa a frequência/porcentagem (gráfico A) e a carga parasitária de macrófagos (gráfico B) de cães vacinados infectados por *L. infantum*, na ausência de linfócitos T. É possível observar que os grupos LBSAP, Leish-Tec[®] e KMP-11

apresentaram uma diminuição da frequência de macrófagos infectados quando comparados ao grupo controle. No gráfico B é possível observar uma redução da carga parasitária dos macrófagos infectados nos grupos LBSap, Leishmune® e KMP-11, que foi calculada pela razão do número total de amastigotas pelo número total de macrófagos infectados (Figura 3).

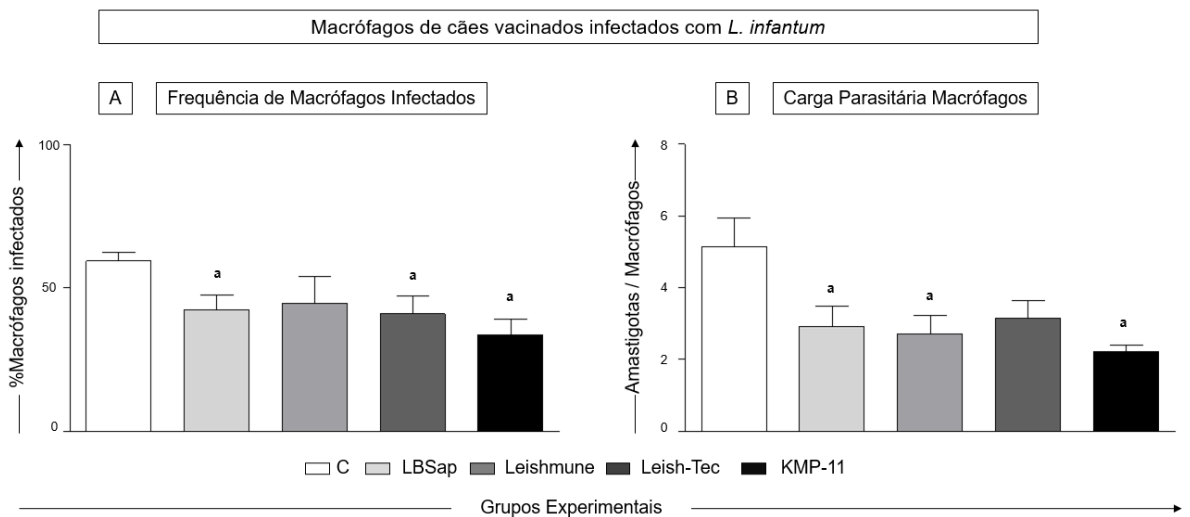


Figura 3: Avaliação de macrófagos de cães vacinados infectados por *L. infantum*, na ausência de linfócitos T. O eixo x ilustra os grupos experimentais: grupo controle - cães não imunizados (C) □; cães imunizados com o imunobiológico LBSap (□); cães imunizados com Leishmune® (□); cães imunizados com Leish-Tec® (■) e cães imunizados com KMP-11 (■). (A) A frequência/percentual de macrófagos infectados está representada no eixo y em valores médios e desvio padrão. (B) A carga parasitária de macrófagos infectados está representada no eixo y e pelos valores médios e o desvio padrão, através da razão entre o número de amastigotas totais pelo número total de macrófagos infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos vacinais em relação ao grupo controle estão representadas pela letra “a”.

Os macrófagos ($M\emptyset$) têm provado desempenhar importante função no controle da replicação do parasito em diferentes ensaios experimentais. Eles fazem parte da defesa do organismo, principalmente em infecções causadas por patógenos intracelulares, atuando na resposta imune inata e na adaptativa (VIANA *et al.*, 2015). A forma promastigota de *L. infantum* se hospeda em macrófagos e se transforma em amastigotas. Os macrófagos, por sua vez, são capazes de atuar na destruição do parasito intracelular, mediada pela produção intracelular de NO e ROS (CARNEIRO *et al.*, 2016). Nossos resultados indicaram que macrófagos derivados de monócitos

após 5 dias de maturação apresentam capacidade fagocítica e atividade microbicida ainda maior em cães imunizados, se comparado ao grupo controle. Em sua pesquisa, Viana (2012) concluiu que o uso de macrófagos neste estágio de maturação é útil para sua aplicabilidade em sistemas de infecção com *L. infantum* e de cocultivo com subpopulações de linfócitos T caninos (VIANA, 2012; VIANA *et al.*, 2013), e trata-se de um método de obtenção celular menos invasivo que a punção medular ou através da cavidade peritoneal (SAMPAIO *et al.*, 2007; ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008). O período de diferenciação *in vitro* das células foi estabelecido baseando-se em um estudo do nosso grupo de pesquisa, cujos monócitos se diferenciaram em macrófagos ao longo de 5 dias e apresentaram uma frequência intermediária de parasitismo e carga parasitária 72h após a infecção por *L. infantum* (VIANA *et al.*, 2013).

Apesar de não termos dosado o NO em nosso cocultivo, acreditamos que a redução e combate ao parasito, encontradas no presente estudo, seja totalmente dependente deste biomarcador (Vianna *et al.*, 2013). O óxido nítrico é produzido pelos macrófagos após a ativação dos macrófagos por citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α (GANTT *et al.*, 2001). Sugere-se que a via do NO de L-arginina induzida por IFN- γ mediada por monócitos/macrófagos é um dos principais mecanismos efetores envolvidos na resposta imune protetora em cães infectados por *Leishmania* (VOULDOUKIS *et al.*, 1996).

A destruição das formas amastigotas ocorre através do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) após ativação do macrófago por IFN- γ e TNF- α , relacionando-se à uma menor carga parasitária de cães naturalmente infectados com *L. infantum* (ZAFRA *et al.*, 2008). Holzmuller e colaboradores (2005) e Lemesre e colaboradores (2007) revelaram também, através de ensaios *in vitro* com macrófagos de cães vacinados e infectados por *L. infantum*, que a redução do índice parasitário estava intimamente relacionada à uma maior expressão de NO, corroborando com a redução da carga parasitária encontrada nos grupos vacinais do nosso estudo.

6.1.2 Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*

A interação entre a resposta inata e a adaptativa estabelece uma memória imunológica por linfócitos B e linfócitos T (CD3⁺) que podem ser capazes de controlar a infecção (GIUNCHETTI, 2007). Durante a infecção, as células T, em específico as células T CD4⁺ T_H1, tentam prevenir a proliferação do parasito e a progressão da doença canina. Tais células produzem IFN- γ , resultando na ativação de macrófagos (TOEPP; PETERSEN, 2020). Os cães infectados apresentam proliferação de células T CD8⁺ citotóxicas, que podem auxiliar no controle de *L. infantum* por causar a destruição de macrófagos infectados (ALEXANDRE-PIRES *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2006b).

Viana e colaboradores (2013) relataram que a inclusão de células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ purificadas em cultura de macrófagos infectados pode ser útil para analisar o impacto da modulação no parasitismo *in vitro*. Empregando um sistema de cocultivo semelhante ao deste trabalho, os autores demonstraram que os níveis de NO eram superiores no sobrenadante de cultura de macrófagos cocultivados com LT CD4⁺ ou LT CD8⁺, acompanhado por uma redução da carga parasitária dos macrófagos de cães do grupo controle. Tais resultados evidenciam o papel das células T e do óxido nítrico no combate ao parasito de *Leishmania in vitro* mesmo em cães controles normais.

Visto que a apoptose intracelular de amastigotas pode ser um efeito precoce de uma resposta imune polarizada do tipo I, torna-se imprescindível o estabelecimento de cocultivos com subpopulações de linfócitos (com elevado grau de pureza), cultivados tanto em associação (T CD4⁺ + T CD8⁺ + M ϕ), como individualmente (T CD4⁺ + M ϕ) e (T CD8⁺ + M ϕ), não sendo recomendada a utilização de linfócitos totais (VIANA, 2012). Com intuito de averiguarmos o papel destas subpopulações de linfócitos na redução da carga parasitária e eliminação do parasito de *Leishmania* pelos macrófagos, empregamos o sistema de purificação, separação e cocultivo *in vitro* destas células com os macrófagos infectados *in vitro*.

A figura 4 retrata a carga parasitária e o percentual de macrófagos infectados por amastigotas de *L. infantum* quando cocultivados com a subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Nos gráficos A e B podemos observar que todos os grupos vacinados apresentaram uma diminuição da frequência de macrófagos infectados e uma redução da carga parasitária, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 4).

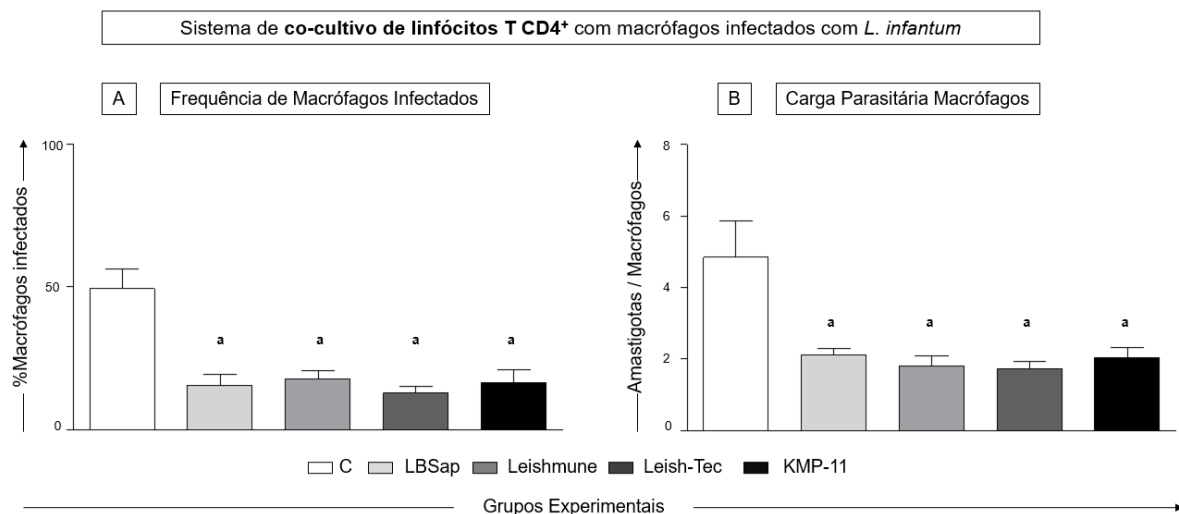


Figura 4: Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: grupo controle - cães não imunizados (C) (□); cães imunizados com o imunobiológico LBSap (▤); cães imunizados com Leishmune® (▥); cães imunizados com Leish-Tec® (▦) e cães imunizados com KMP-11 (▧). (A) A frequência/percentual de macrófagos infectados está representada no eixo y em valores médios e desvio padrão. (B) A carga parasitária de macrófagos infectados está representada no eixo y pelos valores médios e o desvio padrão, através da razão entre o número de amastigotas totais pelo número total de macrófagos infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos vacinais em relação ao grupo controle estão representadas pela letra “a”.

Os linfócitos T CD4⁺ estão associados ao desenvolvimento de uma resposta imune associada à resistência em várias infecções parasitárias, os quais proliferam-se e produzem IFN- γ (SACKS, 2014). Apesar do presente estudo não ter realizado a caracterização da produção de citocinas nas subpopulações de LT CD4⁺ e LT CD8⁺, nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado, em ensaios com cães submetidos à vacinação anti-LVC, a presença dos linfócitos T produtores de IFN- γ como uma das mais inovadoras abordagens no estudo de imunogenicidade de candidatos vacinais (ARAÚJO *et al.*, 2009, 2011; AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020). Neste sentido, a redução da taxa de macrófagos infectados e da carga parasitária dos grupos de cães vacinados poderia estar associada à elevação de IFN- γ , sendo a subpopulação de LT CD4⁺ a principal fonte produtora desta citocina.

6.1.3. Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*

Na figura 5 estão expressos os resultados do sistema de cocultivo de linfócitos T CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*. Ao avaliarmos o percentual de macrófagos infectados, na figura A, é possível observar uma diminuição nos grupos LBSap, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] em relação ao grupo controle. Os grupos LBSap e Leishmune[®] também demonstraram uma redução da carga parasitária dos macrófagos quando comparado ao grupo controle (gráfico B).

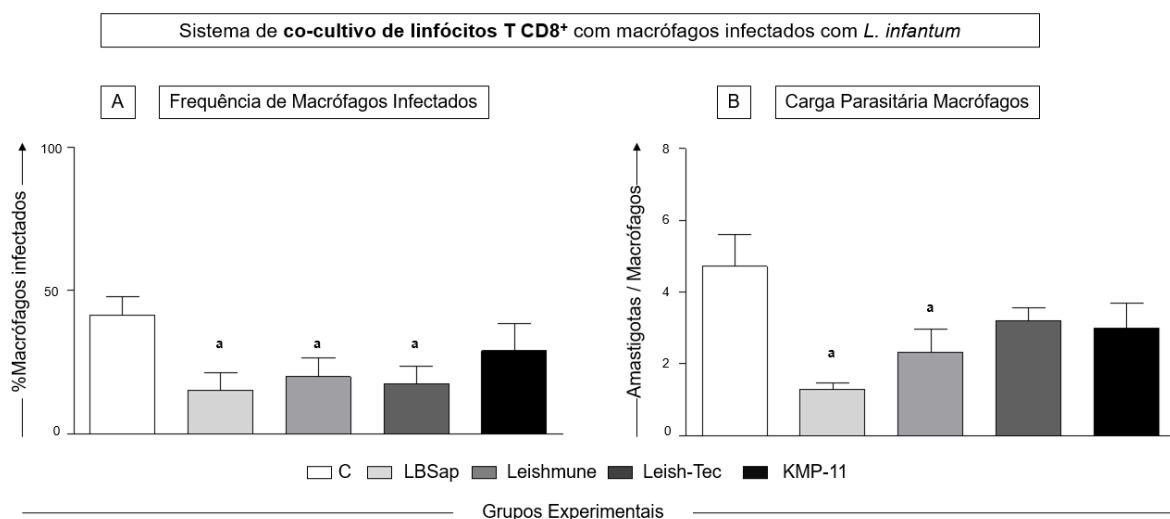


Figura 5: Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: grupo controle - cães não imunizados (C) (□); cães imunizados com o imunobiológico LBSap (□); cães imunizados com Leishmune[®] (■); cães imunizados com Leish-Tec[®] (■) e cães imunizados com KMP-11 (■). (A) A frequência/percentual de macrófagos infectados está representada no eixo y em valores médios e desvio padrão. (B) A carga parasitária de macrófagos infectados está representada no eixo y pelos valores médios e o desvio padrão, através da razão entre o número de amastigotas totais pelo número total de macrófagos infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos vacinais em relação ao grupo controle estão representadas pela letra "a".

Além da produção de citocinas (como IFN- γ , IL-10 e quimiocinas), células T CD8⁺ podem induzir a lise de macrófagos infectados através de mecanismos citotóxicos. Tais mecanismos tornam estas células componentes centrais da imunidade adaptativa (GIUNCHETTI, 2007; PINELLI *et al.*, 1999). Estudos de

diferentes modelos experimentais relaram que a presença de linfócitos T CD8⁺ associado ao perfil de resposta T_h1 relaciona-se ao estabelecimento de uma imunidade protetora (SEDER; HILL, 2000). Em 2014, foi visto uma elevação da carga parasitária de culturas de esplenócitos após a remoção dos linfócitos T CD8⁺, sugerindo o papel destas células na eliminação parasitária (GAUTAM *et al.*, 2014).

6.1.4 Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*

Nosso estudo evidenciou o papel e a importância dos LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ em nosso sistema de cocultivo, principalmente em cães vacinados. Independentemente da vacina testada, observamos uma diminuição do número de macrófagos infectados e de sua carga parasitária nos cães vacinados. Apesar de não termos dosados o NO ou a produção de INF- γ nos linfócitos T em nosso sistema de cocultivo *in vitro*, acreditamos que essas biomoléculas foram as principais responsáveis pela ação contra o parasito, promovida pela memória imunológica relacionada ao processo de imunização com os imunobiológicos testados.

O vacinal comercial Leish-Tec[®] também é capaz de promover aumento de linfócitos T CD8⁺ produtores de INF- γ após as imunizações (SOARES, 2014). De fato, CMSP de cães imunizados com a vacina Leish-Tec[®] demonstraram ser capazes de aumentar a produção da citocina INF- γ , em sobrenadante de culturas estimulados com o antígeno rA2 após as imunizações e após o desafio experimental, interessante, em sobrenadante de culturas estimulados com ASLi foi também evidenciado a produção de INF- γ sete meses após o desafio experimental endovenoso (FERNANDES *et al.*, 2008).

Araújo e colaboradores observaram que o processo de vacinação com Leishmune[®] induziu aumento do percentual de linfócitos T CD4⁺ produtores de INF- γ . De forma interessante, os nossos resultados do cocultivo *in vitro* demonstraram que ambas as subpopulações de linfócitos sozinhas (LT CD4⁺ ou LT CD8⁺) foram capazes de causar uma redução no número e na carga de macrófagos infectados (ARAÚJO *et al.*, 2009, 2011). Estudos de imunogenicidade recentes acerca deste imunobiológico

relataram resultados semelhantes com a elevação da produção de NO e dos níveis de IFN- γ e IL-17 produzidos por células T (COSTA-PEREIRA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2016). Um estudo de cocultivo com uso de Leishmune[®], conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, sugeriu que esse sistema *in vitro* permite a análise rápida da eficácia das vacinas contra a LVC (VIANA *et al.*, 2015).

Resultados de estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o imunobiológico LBSap é capaz de aumentar a produção de IFN- γ tanto em LT CD4⁺ quanto LT CD8⁺ *in vitro* (GIUNCHETTI, 2007; AGUIAR-SOARES, 2020), bem como aumentar a produção de NO e IFN- γ no sobrenadante de culturas de CMSP de cães *in vitro* (RESENDE *et al.*, 2013). Estes resultados incentivam a utilização de antígenos brutos como candidatos vacinais anti-LVC, uma vez que são capazes de promover resposta imune celular e reduzir a taxa de infecção (MAYRINK *et al.*, 1996). A maior capacidade leishmanicida dos macrófagos dos grupos LBSap, Leishmune[®] e Leish-Tec[®], quando em cultivo com linfócitos T CD8⁺, pode estar relacionada à capacidade citotóxica destas células (RESENDE *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 1999).

O grupo KMP-11, por sua vez, foi capaz de reduzir o número de macrófagos infectados apenas quando cocultivado com LT CD4⁺. Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa (SOARES, 2014) demonstraram que após a vacinação com KMP-11 os cães apresentaram aumento apenas de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, não sendo encontrado aumento na produção de IFN- γ por T CD8⁺.

O efeito imunogênico dos imunobiológicos aqui testados em aumentar a produção de IFN- γ em cães vacinados consiste em um importante biomarcador de proteção vacinal (REIS *et al.*, 2010). A citocina pró-inflamatória IFN- γ estimula a atividade citotóxica de células NK (REIS *et al.*, 2009b; VIANA *et al.*, 2016). A produção aumentada de IFN- γ pelos linfócitos é, possivelmente, o mecanismo que explica a redução da capacidade de infecção nos macrófagos, bem como de sua carga parasitária, no sistema de cocultivo pelas diferentes vacinas testadas.

Anteriormente, em 2005, Holzmuller e colaboradores demonstraram que o cocultivo de macrófagos infectados com linfócitos autólogos de cães imunizados com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), resultou em apoptose das formas amastigotas intracelulares pela produção de NO. Em um estudo semelhante, Lemesre e

colaboradores (2007) concluíram que após a incubação de macrófagos derivados de monócitos circulantes do sangue periférico infectados por promastigotas *L. infantum* e cocultivados com linfócitos autólogos de animais vacinados, houve uma proliferação de células T específicas de LiESap, acompanhada de uma maior produção de citocinas e da ativação de macrófagos produtores de NO. Tal desafio experimental exibiu a morte intracelular de *Leishmania* (LEMESRE *et al.*, 2007). Esses resultados podem subsidiar os achados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa.

A avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum* demonstra que apenas o grupo LBSap diminuiu ($p < 0,05$) a frequência de macrófagos infectados em relação ao grupo controle (Gráfico A). Já no gráfico B observamos uma redução ($p < 0,05$) da carga parasitária dos macrófagos nos grupos LBSap e KMP-11 se comparado ao grupo controle (Figura 6).

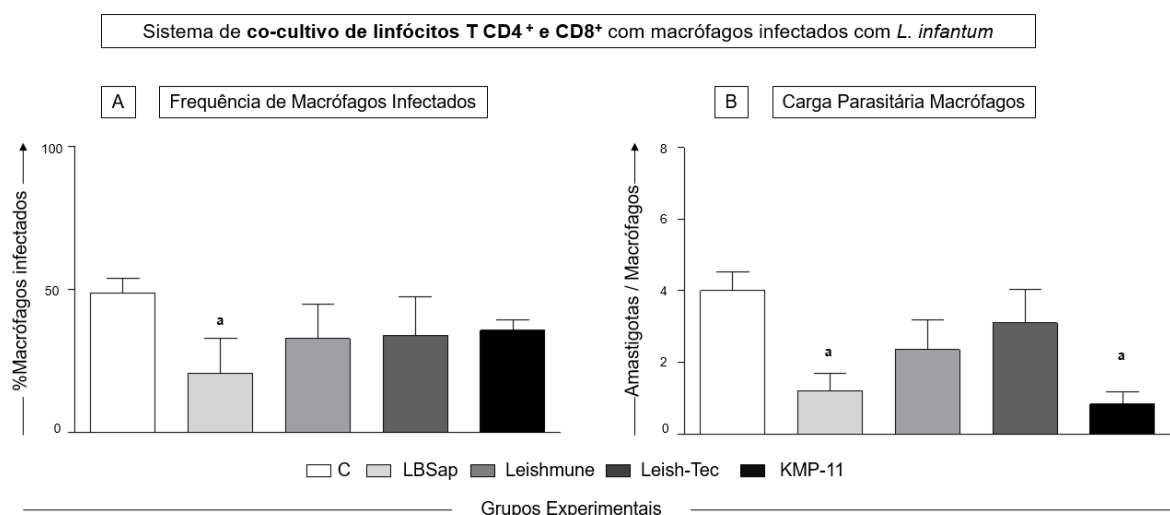


Figura 6: Avaliação do sistema de cocultivo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com macrófagos infectados por *L. infantum*. O eixo x ilustra os grupos experimentais: grupo controle - cães não imunizados (C) (□); cães imunizados com o imunobiológico LBSap (□); cães imunizados com Leishmune® (■); cães imunizados com Leish-Tec® (■) e cães imunizados com KMP-11 (■). (A) A frequência/percentual de macrófagos infectados está representada no eixo y em valores médios e desvio padrão. (B) A carga parasitária de macrófagos infectados está representada no eixo y e pelos valores médios e o desvio padrão, através da razão entre o número de amastigotas totais pelo número total de macrófagos infectados. As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes grupos vacinais em relação ao grupo controle estão representadas pela letra “a”.

Inesperadamente, encontramos uma diminuição do número de macrófagos infectados apenas no grupo LBSap. Pelo perfil de redução no número de macrófagos infectados quando cocultivados com LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ individualmente, esperávamos que, ao associarmos as duas subpopulações celulares, encontraríamos um sinergismo dessa interação contra o parasito de *Leishmania*. Acreditamos que a análise e contagem das lâminas ficou prejudicada por essa interação entre as subpopulações de linfócitos (LTCD4⁺ e LTCD8⁺) e os macrófagos infectados, uma vez que foi observado um menor número de macrófagos disponíveis para contagem. Já havíamos observado uma redução no número de macrófagos no sistema de cocultivo com linfócitos T CD8⁺, possivelmente devido à lise dos macrófagos infectados por esta subpopulação de linfócitos. Nossa hipótese é que houve um aumento na lise das células cocultivadas, quando foi realizado o cocultivo com ambas subpopulações de linfócitos. Anteriormente, Viana e colaboradores (2013) observaram essa diminuição no número de macrófagos, principalmente, ao empregarem proporções linfocitárias maiores em relação ao número de macrófagos. Ainda que empregando apenas cães controle, os autores observaram uma taxa de lise celular maior que 90% em algumas lâminas. Logo, pode se levar em consideração que células de cães imunizados com bons candidatos vacinais desenvolvem uma resposta imune predominantemente do tipo I mais exacerbada, elevando os níveis de lise de macrófagos mantidos em cocultivo a ponto de não haver possibilidade de analisar os resultados, devido ao número limitado de macrófagos, que não deixa a contagem ser suficientemente representativa. Com isso, faz-se necessário um aumento na quantidade do inóculo inicial de macrófagos para, ao final das 72 horas de cocultivo, haver uma quantidade de macrófagos suficientes para a contagem (VIANA *et al.*, 2013).

Nossos resultados indicaram que os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune[®] e Leish-Tec[®] foram capazes de reduzir a carga parasitária e a frequência de macrófagos infectados, sejam esses sozinhos ou em sistema de cocultivo com linfócitos T autólogos. A utilização de cocultivo de macrófagos e células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ purificadas contribui, portanto, na análise da resposta imune adaptativa de cães infectados por *L. infantum*. Dessa forma, torna-se evidente o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção pelo parasito de *L. infantum*.

7 CONCLUSÃO

Considerando as pesquisas anteriores descrevendo a forte imunogenicidade promovida pelas imunizações com as vacinas LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP-11, este estudo aplicou uma nova abordagem baseada em um sistema de

cocultivo utilizando monócitos de cães diferenciados em macrófagos e infectados por *L. infantum*, e subconjuntos purificados de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) após a vacinação. Todos os imunobiológicos testados foram capazes de reduzir a carga parasitária e a frequência de macrófagos infectados, sejam esses sozinhos ou em sistema de cocultivo com linfócitos T autólogos. Nossos resultados indicaram que o sistema de cocultivo possibilitou a identificação do mecanismo de imunogenicidade induzido pela vacinação em cães, nas 4 vacinas testadas, além de associar um mecanismo de efeito (controle leishmanicida *in vitro* por macrófagos infectados por *L. infantum*) em relação à indução da memória pelos linfócitos T. Portanto, o sistema de cocultivo elaborado contribuiu para ampliar o conhecimento científico em torno das metodologias voltadas para a avaliação da imunogenicidade e potência vacinal em ensaios clínicos vacinais de fase I e II. Desta forma, o sistema de cocultivo poderá auxiliar na triagem de possíveis candidatos vacinais com a utilização de amostras de sangue periférico como uma alternativa a métodos invasivos. Os avanços obtidos neste campo da imunoprofilaxia representam um passo significativo no controle da LVH, visto que esse é dependente de um controle efetivo da LVC, que acreditamos depender do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença e que possa ser empregada em larga escala em campanhas de saúde pública na vacinação de cães.

REFERÊNCIAS

- ABDELLAHI, L. *et al.* Vaccination in leishmaniasis: A review article. **Iranian Biomedical Journal**, v. 26, n. 1, p. 1–35, 2022.
- AGUIAR-SOARES, R. D. DE O. *et al.* Phase i and ii clinical trial comparing the lbsap, leishmune[®], and leish-tec[®] vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 4, p. 1–17, 2020.
- ALEXANDRE-PIRES, G. *et al.* Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 3–4, p. 275–283, 2010.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n. 04, p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES, F. *et al.* Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–30, 2018.
- ALVES, G. B. B. *et al.* Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 310–315, 2010.
- ARAÚJO, M. S. S. *et al.* Despite Leishvaccine and Leishmune[®] trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8⁺ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 18, p. 2211–2224, 2008.
- ARAÚJO, M. S. S. *et al.* Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, n. 1–2, p. 64–75, 2011.
- ARAÚJO, M. S. S. *et al.* T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune[®]. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1008–1017, 2009.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.
- BERBERICH, C.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 105–108, 1997.

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

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

BOURDOISEAU, G. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, n. 1–2, p. 21–30, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único [recurso eletrônico], Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 3ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília:Ministério da Saúde, 2014

CARCELÉN, J. *et al.* The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5964–5973, 2009.

CARNEIRO, L. A. Estudo prospectivo sobre a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no estado do Pará. **Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016. Programa**, p. 93, 2016.

CARNEIRO, P. P. *et al.* The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

CARRILLO, E. *et al.* Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1902–1911, 2008.

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 1997.

COSTA, D. N. C. C. *et al.* Control of canine visceral leishmaniasis by euthanasia: Estimated effect based on a survey and mathematical modeling. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 2, p. 1–14, 2020.

COSTA, D. N. C. C. *et al.* Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

COSTA-PEREIRA, C. *et al.* One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BMC Vet. Res.** **11 (11), 92.**, 2015.

DA SILVA, V. O. *et al.* A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, n. 9–10, p. 1082–1092, 2000.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 171–176, 2020.

DE MENDONÇA, L. Z. *et al.* Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec[®] and Leishmune[®] vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 1–6, 2015.

DIAS, Á. F. DE L. R. *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, p. 107947, 2020.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.

DUTHIE, M. S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. **Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments**, v. 34, n. 10, p. 159–176, 2018.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524–530, 2004.

FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.

FERNANDES, C. B. *et al.* Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 2014.

FERNÁNDEZ COTRINA, J. *et al.* A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972–1982, 2018.

FIUZA, J. A. *et al.* Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. **Vaccine**, v. 33, n. 2, p. 280–288, 2015.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.

GAUTAM, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.

GIUNCHETTI, R. C. Avaliação da Imunogenicidade de Dois Novos Imunobiológicos Candidatos a Vacina Contra Leishmaniose Visceral Canina. p. 203, 2007.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 623–638, 2008a.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 106–112, 2008d.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, n. May, p. 87–97, 2019.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 269–277, 2008b.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, n. 1–2, p. 23–33, 2008c.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 2–3, p. 100–107, 2006.

GONÇALVES, A. A. M. *et al.* An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New

Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. December, 2019.

GRIMALDI, G. *et al.* Field trial of efficacy of the Leish-tec[®] vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–18, 2017.

HOLZMULLER, P. *et al.* Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* coincubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 3–4, p. 247–257, 2005.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23–24, p. 1272–1281, 2013.

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

LEMESRE, J. L. *et al.* Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4223–4234, 2007.

LEMESRE, J. L. *et al.* Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825–2840, 2005.

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

MAYRINK, W. *et al.* Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 695–697, 1996.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 39–49, 2011.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

MICHELIN, A. DE F. *et al.* Factors associated with positivity for canine visceral leishmaniosis in an endemic area in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, n. January, p. 13–16, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. Nota Técnica Conjunta nº001/2016. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>. Acesso em: 20/04/2022

MOREIRA, M. L. *et al.* Vaccination against canine leishmaniosis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 33–45, 2016.

MORENO, J. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. JUN, p. 1–10, 2019.

MORENO, J. *et al.* Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates an appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 326–333, 2003. NATEGHI ROSTAMI, M. *et al.* Differential in vitro CD4⁺/CD8⁺ T-cell response to live vs. killed *Leishmania major*. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 2, p. 101–110, 2010.

NICO, D. *et al.* The adjuvanticity of *Chiococca alba* saponins increases with the length and hydrophilicity of their sugar chains. **Vaccine**, v. 30, n. 21, p. 3169–3179, 2012.

NOAZIN, S. *et al.* First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759–6767, 2008.

NOGUEIRA, F. S. *et al.* Leishmune[®] vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4805–4810, 2005.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico nas américas. OPAS/OMS. **Informe de Leishmanioses Nº 7**, v. 1, p. 1–27, 2019. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?seq>>. Acesso em: 04/04/2022

OUATTARA, G. M. *et al.* Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments : v. 31, n. 4, p. 1–30, 2018.

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

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO). Leishmaniasis, 2022. PAHO/WHO. Disponível em: < <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis#:~:text=Visceral%20leishmaniasis,-Key%20facts&text=Globally%2C%20leishmaniasis%20is%20among%20the,people%20at%20risk%20of%20infection>>. Acesso em: 04/04/2022

PINELLI, E. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINELLI, E. *et al.* Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999.

PINELLI, E. *et al.* *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594–1600, 1995.

RAFATI, S. *et al.* Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3716–3725, 2005.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REGINA-SILVA, S. *et al.* Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.

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

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

REIS, A. B. *et al.* Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 2006a.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006c.

REIS, A. B. *et al.* Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006b.

REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009a.

RESENDE, L. A. *et al.* Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 3–4, p. 371–381, 2013.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, 2018.

ROATT, B. M. *et al.* Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

SACKS, D. L. Vaccines against tropical parasitic diseases: A persisting answer to a persisting problem. **Nature Immunology**, v. 15, n. 5, p. 403–405, 2014.

SAMPAIO, W. M. *et al.* In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 1–9, 2007.

SCOTT, P.; RILEY, E. M. Acquired Immunity to Intracellular Protozoa. **The Immune Response to Infection**, p. 301–311, 2014.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. S. Infections Requiring Cellular Immunity. **Nature**, v. 406, n. August, p. 793–798, 2000.

SEVÁ, A. P. *et al.* Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2016.

SMITH, S. M. *et al.* Characterization of human Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin- reactive CD8⁺ T cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5223–5230, 1999.

SOARES, R. D. O. A. Ensaio clínico vacinal de Fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina. 2014. 139. Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Laboratório de Imunopatologia, 2014.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

STEBECK, C. E. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 1–13, 1995.

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Recent Advances in Vaccines Against *Leishmania* Based on Patent Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 21–32, 2017.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, n. January, p. 19–25, 2020.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.

VIANA, K. F. Metodologia para ensaios de candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina pelo cocultivo de linfócitos e macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

VIANA, K. F. *et al.* Analysis using canine peripheral blood for establishing in vitro conditions for monocyte differentiation into macrophages for *Leishmania chagasi* infection and T-cell subset purification. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1–2, p. 62–71, 2013.

VIANA, K. F. *et al.* Application of rapid *in vitro* coculture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (LdCen-/-). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.

VIANA, K. F. *et al.* Setting the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells cocultured with canine macrophages infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3–4, p. 124–132, 2015.

VIEIRA, J. F. P. Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos no baço, fígado e em células derivadas de leucócitos circulantes, em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, assintomáticos ou sintomáticos. 125. Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Laboratório de Imunopatologia, 2018.

VITORIANO-SOUZA, J. *et al.* Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. **Psychiatry Research**, v. 14(4), n. January, p. 293, 2020.

VOULDOUKIS, I. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 253–256, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis, 2022a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 04/04/2022>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis, 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 04/04/2022>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>. Acesso em: 04/04/2022

ZAFRA, R. *et al.* High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 353–359, 2008.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL. 83, p. 1–18, 2008.

ANEXO 1



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: csua@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).

CERTIFICADO

Este certificado expira em dezembro/2013.

Ouro Preto, 26 de abril de 2011.

P/Wanderson Geraldo de Lima
Prof. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP